

DIE CHEMISCHE ANALYSE.

Die chemische Analyse.

Sammlung von Einzeldarstellungen auf dem
Gebiete der chemischen, technisch-chemi-
schen und physikalisch-chemischen Analyse.

Unter Mitwirkung von Prof. Dr. Abderhalden-Halle, Prof. Dr. Autenrieth-Freiburg, Prof. Dr. H. Biltz-Breslau, Prof. Dr. Birkenbach-Clausthal, Prof. Dr. W. Böttger-Leipzig, Prof. Dr. Bredig-Karlsruhe, Prof. Dr. Brunck-Freiberg, Prof. Dr. Classen-Aachen, Dir. Dr. Dafert-Wien, Prof. Dr. Dennstedt-Tzschschelien, Prof. Dr. H. Ditz-Prag, Prof. Dr. Ed. Donath-Brünn, Prof. Dr. F. Ephraim-Bern, Prof. Dr. Eschweiler-Hannover, Prof. Dr.-Ing. Artur Fischer-Berlin †, Prof. Dr. H. Großmann-Berlin, Prof. Dr. Gutbier-Jena, Prof. Dr. Haber-Berlin, Priv.-Doz. Dr. O. Hauser-Berlin †, Prof. Dr. W. Herz-Breslau, Prof. Dr. R. O. Herzog-Berlin, Prof. Dr. Hinrichsen-Berlin †, Prof. Hönig-Brünn, Prof. Dr. W. P. Jorissen-Leiden, Prof. Dr. Kippenberger-Bonn, Prof. Dr. Kremann-Graz, Prof. Dr. Kurtenacker-Brunn, Prof. Dr. Lissner-Brunn, Prof. Dr. Lottermoser-Dresden, Prof. Dr. W. Marckwald-Berlin, Prof. Dr. H. Meyer-Prag, Prof. Dr. R. J. Meyer-Berlin, Prof. Dr. L. Moser-Wien, Prof. Dr. Neuberg-Berlin, Prof. Dr. B. Neumann-Breslau, Dir. Dipl.-Ing. Nissenson-Stolberg, Dir. Dr. Paessler-Freiberg, Prof. Dr. L. Rosenthaler-Bern, Chefred. Dr. W. Roth-Cothen, Prof. Dr. Ruff-Breslau, Prof. Dr. E. Rupp-Breslau, Priv.-Doz. Dr. Schleicher-Aachen, Prof. Dr. J. Schmidt-Stuttgart, Prof. Dr. Skrabal-Graz, Prof. Dr. Stähler-Berlin, Prof. Dr. Stoklasa-Prag, Dir. Dr. Teichert-Wangen, Prof. Dr. Ubbelohde-Karlsruhe, Prof. Dr. Ulrich-Brünn, Prof. Ulzer-Wien, Prof. Dr. Vortmann-Wien, Prof. Dr. Wegscheider-Wien, Prof. Dr. H. Wislicenus-Tharandt, Prof. Dr. Wöhler-Darmstadt, Prof. Dr. Wölbling-Berlin, Priv.-Doz. Dr. Gertrud Woker-Bern und anderen Fachgenossen

herausgegeben von

Dr. B. M. Margosches,

o. ö. Professor an der Deutschen Technischen Hochschule Brünn

XXIII./XXIV. Band:

Die Katalyse.

Die Rolle der Katalyse in der analytischen Chemie.

Von

Privatdoz. Dr. Gertrud Woker,

Vorstand des Instituts für physikalisch-chemische Biologie der Universität Bern.

**II. Spezieller Teil. Zweite Abteilung:
Biologische Katalysatoren.**

1. Hälfte: Hydrolysierende Fermente.

Mit 4 Abbildungen.

STUTTGART.

VERLAG VON FERDINAND ENKE.

1924.

Die Katalyse.

Die Rolle der Katalyse in der analytischen Chemie.

Von

Privatdoz. Dr. Gertrud Woker,

Vorstand des Instituts für physikalisch-chemische Biologie der Universität Bern.

**II. Spezieller Teil. Zweite Abteilung:
Biologische Katalysatoren.**

1. Hälfte: Hydrolysierende Fermente.

Mit 4 Abbildungen.



STUTT GART.

VERLAG VON FERDINAND ENKE.

1924.

Alle Rechte, insbesondere das der Uebersetzung, vorbehalten.

Copyright 1924 by Ferdinand Enke, Publisher, Stuttgart.

Meinen lieben Eltern
gewidmet.

Vorwort.

Der III. Band der „*Katalyse*“, welcher diejenigen *Biologischen Katalysatoren* umfaßt, die als *Hydrolysierende Fermente* bezeichnet werden, stellt mit dem in kurzem folgenden IV. Band die 2. Hälfte des Speziellen Teils der „*Katalyse*“ dar. Ursprünglich sollte die 2. Hälfte des Speziellen Teils der 1. Hälfte (Anorganische Katalysatoren) unmittelbar folgen, repräsentierte sie doch nur einen Abschnitt des Speziellen Teils, von welchem das ganze Manuskript zusammenhängend gesetzt war und als Fahnenkorrektur vorlag, als innere und äußere Gründe, wie der Umfang der „*Anorganischen Katalysatoren*“, die Trennung des Speziellen Teils in zwei gesondert erscheinende Hälften notwendig machten. Während des Umbruchs der 2. Hälfte, die in die schlimmsten Jahre fiel, die Deutschland durchzumachen hatte, stellten sich nun alle möglichen Schwierigkeiten, wie Papiermangel, Setzermangel usw. ein, so daß schließlich das Erscheinen der 2. Hälfte auf eine bessere Zeit nach dem Kriege hinausgeschoben werden mußte. Als dann nach Jahren die Arbeit wieder aufgenommen werden konnte, war das Bild, das die Fermentforschung bot, in mancher Hinsicht ein anderes geworden. Da nun ein großer Teil des Buches schon umbrochen war, so daß darin keine Aenderungen und Nachträge mehr möglich waren, mußte sich die Verfasserin darauf beschränken, im Schlußkapitel (Anhang) diejenigen Punkte herauszugreifen, die (wie die in der Einleitung und in einem Sonderkapitel behandelte Theorie der Diastasewirkung sowie alle damit zusammenhängenden Fragen) durch die inzwischen erfolgte Neuorientierung, namentlich in der Erforschung der Konstitution der höheren Kohlenhydrate, eine grundlegende Verschiebung erfahren hatten. Dagegen wurde von einer Nachführung der übrigen Literatur Abstand genommen. Ihre Darstellung, unter Wahrung des Zusammenhangs mit den in den entsprechenden Kapiteln behandelten, verwandten Tatsachen, hätte den Anhang zu sehr belastet, und ein bloßes Literaturverzeichnis zu geben,

erschien um so entbehrlicher, als die Nachträge zu allen Teilen der „*Katalyse*“ nach Abschluß des ganzen Werkes in zusammenfassender Darstellung folgen sollen.

Nach dem Vorausgeschickten ist es wohl selbstverständlich, daß der vorliegende, die hydrolysierenden Fermente behandelnde Band der „*Katalyse*“ keinen Anspruch erheben kann, eine vollkommene Darstellung der einschlägigen Tatsachen und Probleme zu sein. In einem so rapid sich ausdehnenden und doch in seinen Grundlagen noch so unerforschten Gebiet wie demjenigen der Fermente — in dem zu allen sonstigen Schwierigkeiten die widerspruchsvollsten Literaturangaben den Blick zu trüben vermögen — kann es sich schon unter normalen Bedingungen nicht um eine vollkommene Darstellung auf beschränktem Raum handeln. Treten dann noch besondere Erschwerungen, wie sie der Krieg im Gefolge hatte, hinzu, so wachsen damit auch jene Mängel, die einem Werk ohne Verschulden des Autors anhaften. Obschon sich dieselben aus den angegebenen Gründen im vorliegenden Fall besonders fühlbar machen, hofft die Verfasserin doch, daß der III. Band der „*Katalyse*“ den Forschern in all den zahlreichen verschiedenartigen Disziplinen etwas zu geben vermag, die mit den *Hydrolysierenden Fermenten* irgendwie in Berührung kommen, auch wenn es nur ein Teil desjenigen ist, was unter günstigeren Umständen hätte geboten werden können.

Dem analytischen Zweck der *Sammlung* entsprechend, als deren XXIII./XXIV. Band der vorliegende Teil der „*Katalyse*“ erscheint, nimmt die Beschreibung solcher Methoden der Fermentermittlung einen breiten Raum ein, die sich bei biochemischen Untersuchungen an tierischem und pflanzlichem Material bewährt haben. Der Natur der Sache nach spielen die klinischen Untersuchungsmethoden in diesem Gebiet eine große, praktisch wohl die wichtigste Rolle und es sind daher die verschiedensten Verfahren der Magen- und Pankreassaftuntersuchung und, bei den gebräuchlichsten Methoden, ihre Fehlerquellen besprochen worden. Das Gegenstück zu jenen Verdauungsfermenten des Magen-Darmkanals wird repräsentiert durch die Fermente, welche Träger der parenteralen Verdauung sind. Die verschiedenen Reaktionen des lytischen Immunkörpers sowohl als die Abwehrfermentreaktionen, welche letztere Abderhalden beim Kreisen von blutfremdem Material im Blut, bzw. Serum, beobachtet hat, haben als Manifestationen der parenteralen Verdauung ihre Darstellung gefunden.

Man wird sich vielleicht daran stoßen, daß so in sich abgeschlossen scheinenden Gebieten, wie gerade der Immunitätswissenschaft, ein natürlich aufs äußerste zusammengedrängter Ueberblick gewidmet worden ist. Schon der Umstand, daß in dieser Uebersicht auf die Angabe der ungeheuren Literatur verzichtet wurde, zeigt, daß das vorliegende Werk nicht etwa beansprucht, ein Ersatz für die verschiedenen ausgezeichneten Spezialwerke zu sein. Die Verfasserin, die selbst dem vortrefflichen Werk „Die Immunitätswissenschaft“ von Much (Würzburg 1911)¹⁾ die größte Anregung verdankt, ist vielmehr der Meinung, daß die Uebersicht, wie sie in den einschlägigen Kapiteln des vorliegenden Buches gegeben ist, einem gründlichen Studium bei all denjenigen vorzuarbeiten vermag, für welche das Interesse für ein neues Gebiet erst dann erwacht, wenn dieses in lebendigen Kontakt mit ihrem eigenen Arbeitsfeld gelangt. Die außerordentliche Verbreitung der biologischen Katalysatoren wie das Gemeinsame ihrer Reaktionsbeeinflussung bringen es mit sich, daß sie wie nichts anderes befähigt sind, scheinbar weit auseinanderliegende Disziplinen miteinander zu verbinden. Die Verfasserin hat denn auch dieses Privilegium der Katalysatoren in vollem Maße ausgenutzt, und wo nicht schon die Berührungspunkte klar zutage traten, bemühte sie sich, solche aufzufinden. Das überall durchklingende Bestreben, die Zusammenhänge herzustellen, gibt manchen Kapiteln des vorliegenden Buches einen stark theoretischen — um nicht zu sagen hypothetischen — Einschlag.

Auch dies wird vielleicht von vielen als ein Mangel empfunden; denn man hat die Wissenschaft in den letzten Jahrzehnten so sehr auf das ausschließlich Experimentelle orientiert, daß man darob das Geistige, die Idee, beinahe vergessen hat, oder doch vielfach glaubt, derselben im einzelnen entraten zu können, weil irgendwo irgend eine Autorität für den gedanklichen Rückhalt sorgt, an den man sich anlehnen kann. Hinzu kommt, daß die Aufteilung in Hunderte von Spezialgebieten dazu geführt hat, daß in der Wissenschaft eine Art Fabrikbetrieb eingerissen ist. Wie der Arbeiter, so stellt der eine Wissenschaftler dieses, der andere jenes Stück her, nach einem Schema, das von jener Autorität entworfen worden ist, von der der betreffende Wissenschaftler ab-

¹⁾ Eine unter anderem Titel erschienene neuere Auflage dieses Werkes kam der Verfasserin erst vor kurzem, als auch das Anhangkapitel schon umbrochen war, zu Gesicht, so daß sie leider nicht mehr berücksichtigt werden konnte.

hängt. Dieser letztere wird selten in den Fall kommen, seiner Arbeit das Gepräge der eigenen Persönlichkeit zu verleihen. Er schöpft nicht selbst an der Quelle der Natur. Er tritt nicht unbeeinflusst durch fremdes Denken an die Probleme, die er bearbeitet, heran. Er sieht vielmehr durch die Brille seines Vorgesetzten, der die gedankliche Arbeit für ihn besorgt und die Stücke zusammensetzt, die ihm die verschiedenen Arbeitskräfte liefern.

Die Organisation der Wissenschaft, d. h. ihre Umwandlung in einen wissenschaftlichen Betrieb, hat unbestritten zu einer ungeheuren Vermehrung der Stückzahl in der wissenschaftlichen Produktion geführt. Aber ist das alles? Müssen wir nicht viel mehr fordern? Vermag uns diese Entwicklung in die Breite, die Flut des oftmals sich widersprechenden Tatsachenmaterials, dem wir dank dieser Entwicklung gegenüberstehen, innerlich wirklich das zu bieten, was wir von der Wissenschaft erwarten, wenn wir uns mit heiliger Begeisterung ihrem Tempeldienste weihen? Beschleicht uns nicht oftmals das Gefühl, weniger wäre mehr, d. h. weniger Tatsachen, aber dafür das Tatsächliche so vertieft, so durchdacht, daß es für uns Leben gewinnt und Seele? — Und wenn das nicht zu finden ist in einer allzu einseitig auf das Materielle und den äußeren Erfolg eingestellten dominierenden wissenschaftlichen Richtung, dann wenden wir uns anfangs vielleicht unbewußt, später bewußt von ihr ab und treten unvermittelt an die Probleme selbst heran. Ueber sie nachzudenken, sich eine eigene Meinung zu bilden und diese Meinung frei heraus zu sagen, allem Autoritätenglauben zum Trotz, erscheint uns wissenschaftliche Pflicht. Darum hat auch die Verfasserin mit ihrer eigenen Auffassung, in allen einschlägigen Fragen, nicht zurückgehalten. Man mag diese Auffassung akzeptieren oder nicht, das ist nebensächlich. Wenn man sie nur nicht kritiklos akzeptiert oder kritiklos verwirft. Beides ist gleich schlimm; denn es gibt kein Problem, das nicht freundschaftlicher Diskussion bedürfte, in der sich die Anschauungen gegenseitig klären. Dies hat natürlich zur Voraussetzung, daß sich die Wissenschaftler statt auf ihre Bekämpfung, wie es leider häufig noch der Fall ist, auf gegenseitige Hilfe einstellen und daß ihr Schaffen statt von persönlichen Gesichtspunkten von einem Ideal getragen und von einem allen gemeinsamen Gedanken geleitet wird: „Wie diene ich meiner Wissenschaft am besten?“

Der vorliegende Band der „*Katalyse*“ hat seinen Zweck erfüllt, wenn es ihm vergönnt ist, nicht nur der Verbreitung von Tatsachen und Arbeitsmethoden aus dem Gebiet der biochemischen Analyse in all den verschiedenartigen Forscherkreisen zu dienen, die sich um das weitverzweigte Gebiet der Katalyse interessieren, sondern außerdem zum Nachdenken anzuregen über die Fermente und all die unge lösten Fragen, die mit ihrem Dasein, ihrer Wirkung und ihrer Bildung verknüpft sind.

Die Verfasserin gestattet sich, all denjenigen den herzlichsten Dank auszusprechen, die am Zustandekommen des vorliegenden Bandes in so wertvoller Weise mitgewirkt haben. Sie dankt insbesondere dem keine Mühe, keine Schwierigkeiten und Kosten scheuenden großzügigen Verlag Herrn Ferdinand Enke in Stuttgart, dem allzeit hilfsbereiten Herausgeber der Sammlung „Die chemische Analyse“, Herrn Professor Margosches in Brünn, der so gütig war, die Korrekturen, wenn immer möglich, durchzusehen und seine freundlichen Ratschläge zu erteilen, sowie Fräulein cand. med. Greti Fischer in Basel, die manche Ferienwoche für die Herstellung von Literaturauszügen lebenswürdigerweise geopfert hat, und Herrn Gymnasiallehrer Dr. Robert Müller in Bern für die freundliche Durchsicht der Korrekturbogen zoologischen Inhalts.

Oberstampbach bei Merligen

(Thuner See, Schweiz), September 1924.

Gertrud Woker.

Inhaltsübersicht.

	Seite
Einleitung	1— 30
Die Toxine	25— 30
Hydrolisierende Fermente	30—537
1. Saccharifizierende Fermente	32—159
a) Disaccharasen	35— 76
1. Identifizierung der Disaccharate	35— 39
2. Identifizierung der Disaccharasen	39— 43
Invertase	40— 60
Die Rohrzuckerbestimmung mittels Invertase	43— 44
Die Ermittlung der Invertase	44— 54
Die Bedeutung der Theorie der Invertasewirkung für die In-	
vertasebestimmung	54— 60
Maltase	60— 68
Trehalase	68— 69
Laktase	69— 75
Melibiase, Turanase, Gentiobiase und Cellobiase	75— 76
b) Trisaccharasen	76— 78
Raffinase	76— 78
c) Tetrasaccharasen	78
Stachyase	78
d) Polysaccharasen, welche die komplizierte-	
sten Kohlenhydratespalten	78—140
Diastase (Amylase)	78—131
Die Diastaseermittlung	95—113
Diastasebestimmung durch Ermittlung des gebildeten Zuckers	96—100
a) Die Reduktionsverfahren	96— 99
b) Die Moore-Hellersche Reaktion in ihrer Anwendung auf die	
Starkebestimmung	99—100
Diastasebestimmung durch Ermittlung des Verschwindens der	
Starke	100—107
a) Die Starkeverflüssigung	100—102
b) Verfahren, die sich zur Ermittlung des Diastasegehaltes von	
Fermentpräparaten auf das Verschwinden oder die Aende-	
rung der Jodstärkereaktion gründen	102—107
Physikalisch-chemische Verfahren	107—113
Die Beeinflussung der diastatischen Wirksamkeit von Körper-	
flüssigkeiten durch pathologische Zustände und die Zu-	
sammensetzung der Nahrung	113—117
Zur Theorie der Diastasewirkung	118—129
Zytase (Zellulase) und verwandte Fermente	131—134
Inulinase	134—140
Glykosidasen	140—157
Das Emulsin	141—155
Anwendung des Emulsins zur Identifizierung, Konstitutions-	
und Konfigurationsbestimmung von Glykosiden und Poly-	
sacchariden	147—149

	Seite
Anwendung der Glykosidspaltung für die Ermittlung des Emulsins	149—155
Das Myrosin	155—157
Zusammenfassung	158—159
2. Proteasen (proteolytische Fermente)	159—400
Der Nachweis der Proteasen	164—167
Die Differenzierung der Proteasen	167—175
Die quantitative Bestimmung der Proteasen	175—245
1. Methoden, die sich der Auflösung erstarrten Blutserums bedienen	176
2. Methoden, die sich der Fibrinlösung bedienen	176—181
a) Die Pepsinbestimmungsmethode von Grützner	176—178
b) Die Pepsinbestimmungsmethode von Grünhagen	178—180
c) Andere Fibrinauflösungsmethoden	180—181
3. Methoden, die sich der Lösung von Eiereiweiß bedienen	181—197
a) Verfahren, bei denen die Eiweißoberfläche im Verlauf der Verdauung abnimmt	181—182
b) Verfahren, bei denen die Eiweißoberfläche im Verlauf der Verdauung konstant gehalten wird (Methode von Mett)	182—197
4. Methoden, die sich gelösten Eiweißes irgendwelcher Provenienz bedienen	197—245
I. Verfahren zur Ermittlung einer partiellen Aufspaltung des nativen Eiweißes zu nicht mehr fallbaren Produkten	198—200
a) Gewichtsanalytische Methoden zur Messung des Eiweißverlustes	198
b) Volumetrische Methoden zur Messung des Eiweißverlustes	199—200
c) Methoden, die auf der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl basieren	200
II. Verfahren zur Ermittlung einer totalen Aufspaltung des nativen Eiweißes zu nicht mehr fallbaren Produkten	201—207
III. Physikalisch-chemische Methoden	207—218
a) Zur Messung der Abnahme des nativen Eiweißes	207—208
Die Bestimmung der Viskositätsverminderung	207—208
b) Zur Messung der Zunahme der Verdauungsprodukte	208—218
Die Ermittlung des Zuwachses an ionisierten und nicht-ionisierten Eiweißspaltprodukten	209—210
Die optischen Methoden	210—218
IV. Chemische Methoden zur Messung der Zunahme der Verdauungsprodukte	218—245
Die Ermittlung der Peptasekomponente des Trypsins und der Nachweis selbständiger Peptasen (Polypeptidasen)	223—228
Gesetzmäßigkeiten bei der Wirkung von Tryptasen und Peptasen und deren Störungsquellen	228—233
Methoden, die der Ermittlung der Peptasen im besonderen dienen	234—237
Die Ermittlung von Pflanzenproteasen	237—238
Autolytische Methoden	238—251
Die Anwendung der Autolyse zum Nachweis und zur Gewinnung pflanzlicher Proteasen	238—239
Die Ermittlung der Autolyse tierischer Organe	240—244
Die Ermittlung der Heterolyse tierischer Organe	244—245
Begünstigende und hemmende Faktoren bei der Autolyse	246—250
Anwendung von Proteasen zur Substratbestimmung	251—254
Die Koagulasen	254—313
Das Labferment	254—290
Historisches	254—255

	Seite
Theoretisches über das Labferment	255—279
Beziehungen zwischen Lab-, Pepsin- und Trypsinwirkung	255—261
Faktoren, welche den Lab- und Pepsineffekt eines Magen- saftes verschieben	261—267
Die kolloidchemische Beeinflussung des Gerinnungsprozesses durch Kationen und Anionen	267—274
Die Labwirkung pflanzlicher Proteasen	274—278
Die Labwirkung bei der parenteralen Eiweißverdauung	278—279
Die Ermittlung von Labferment und Labzymogen	279—283
Gesetzmäßigkeiten bei der Labwirkung	283—289
Anwendung der Labwirkung zur Substratbestimmung	289—290
Die Bestimmung des Käsestoffs	289—290
Das Fibrinferment (Thrombase, Thrombin)	290—313
Historisches	290—291
Theoretisches über das Fibrinferment	291—299
Die Prüfung auf ertiges Fibrinferment, Thrombogen und Thrombokinasen sowie Fibrinogen	299—304
Die Gerinnungszeit	303—304
Beziehungen zwischen Fibrinferment und anderen Proteasen	304—313
Hemmungstoffe der Proteolyse	313—334
Theoretisches über die Hemmungstoffe der Proteasewirkungen	314—321
Die klinische Bedeutung des Antitrypsinnachweises	321—325
Die Ermittlung der Antitrypsinmenge eines Serums	325—328
Die Plasteinreaktion	328—331
Die Ermittlung von Antilab in Körperflüssigkeiten	331—332
Die Ermittlung von Antipepsin in Körperflüssigkeiten	332—334
Der lytische Immunkörper und die Abwehrfer- mente	334—395
Die Präzipitinreaktion und ihre Anwendungen	335—340
Die Anwendung zur Typhusdiagnose nach Ficker und andere klinische Präzipitinmethoden	335—336
Die Anwendung der Präzipitinreaktion zur Eiweißdifferenzierung höherer Tiere	336—340
Die Erkennung der Blutsverwandtschaft	336—337
Der forensische Blutnachweis	337—338
Die Untersuchung auf Nahrungsmittelverfälschung	338—340
Der Bienenhonig	338—339
Die Echtheitsprüfung von Bienenhonig	339—340
Die Agglutination und ihre Anwendungen	340—344
Die Anwendung der Agglutinationsprobe zur Untersuchung von Sera mit bekanntem Bakterienmaterial unter be- sonderer Berücksichtigung der Gruber-Vidalschen Typhus- reaktion	341—343
Die Anwendung der Agglutinationsprobe zur Untersuchung fraglicher Bakterienstämme mit bekannten Sera	343—344
Bakterienlyse und Bakteriozidie	344—346
Physikalisch-chemische Reaktionen auf den lytischen Immun- körper	346—348
Die Meistagminreaktion	346—348
Die indirekten Nachweismethoden des lytischen Immunkörpers	348—367
Die Ueberempfindlichkeitsreaktion (Anaphylaxie), ihre Theorie und ihre Anwendungen	350—358
Die Opsoninreaktion und ihre Anwendung	358—362
Die Komplementbindungsreaktion und ihre Anwendungen	362—367
Die Anwendung der Komplementbindungsreaktion zur Unter- suchung verdächtiger Bakterienstämme mit bekannten Sera oder umgekehrt	363—366
Die Komplementbindung	363—364
Die Komplementbindung	364—365

	Seite
Die Eiweißdifferenzierung im engeren Sinn mit besonderer Berücksichtigung des forensischen Blutnachweises . . .	365—366
Die Wassermannsche Reaktion (unspezifische Komplement-bindungsreaktion)	366—367
Die Reaktionen auf blutfremdes Material	367—395
Die Psychosereaktion von Geißler	367—369
Die Abwehrfermentreaktionen von Abderhalden	369—395
Chemische Nachweismethoden des Eiweißabbaus am Dialysat	382—390
Die Prüfung auf Undurchlässigkeit für Eiweiß	383—384
Die Prüfung auf gleichmäßige Durchlässigkeit der Eiweißabbauprodukte	384—386
Die Zubereitung des zur Verwendung kommenden Organs	386—387
Gewinnung und Vorbehandlung des Serums	387—388
Physikalisch-chemische Nachweismethoden des Eiweißabbaus	391—395
Die physiologische Bedeutung der parenteralen Verdauung .	395—400
Vom Wesen der Sekretion	400—422
Die Sekretionstheorie der Antikörperproduktion	422—434
Die Amidasen	434—452
Histozym und Urease	435—438
Die Arginase	438—439
Kreatase und Kreatinase	439—442
Guanase, Adenase und andere Purinamidasen	442—448
Die Funktionsprüfung der Pankreasdrüse mittelst der Kernprobe von Schmidt	449
Die Teilphasen der Aufspaltung der Nukleoproteide	449—452
Die Ermittlung der Nukleasen	452—453
Die Feststellung des Verschwindens oder der Abnahme der Nukleinsäuren	453—456
a) Die Nukleinsäureverflüssigung	453—455
b) Die polarimetrische Ermittlung der Nukleinsäurespaltung	455—456
Die Feststellung des Auftretens von Spaltprodukten und Nukleinsäuren	456—458
a) Die Ermittlung der Nukleotidase	456—457
b) Die Ermittlung der Nukleosidase	457—458
Esterasen (Lipasen)	458—506
Die Lipaseermittlung und ihre Anwendungen	475—482
Anwendung der Lipasebestimmung zur Funktionsprüfung der Pankreasdrüse	477—479
Anwendung der Lipasebestimmung zur Ermittlung des Wirkungswertes von Pankreaspräparaten	479—482
Die Variationen des Substrates bei der Bestimmung von Lipasen verschiedener Herkunft	482—500
a) Butter als Substrat	482—483
b) Lezithin als Substrat und die Frage der Spezifität der Lezithinase	483—486
c) Monobutyryn als Substrat und die Frage der Spezifität der Monobutyrynase	486—491
d) Tributyrin als Substrat	491—493
1. Anwendung zur Lipaseermittlung im Blut und im Magensaft	491—492
2. Anwendung zur Unterscheidung von Magenlipase und Pankreaslipase	492—493
e) Amylsalizylat und andere Ester, die keine Fettkomponente enthalten als Substrat und die Frage der Spezifität ihrer Esterasen	493—499
f) Phytase und Chlorophyllase	499—500
Die fermentative Estersynthese	500—506
Anhang zum Abschnitt Hydrolysierende Fermente	506—537
Sachregister	538—559
Autorenregister	560—583

Katalyse durch Fermente.

Einleitung.

Die Katalyse berührt wie kein anderes Gebiet der physikalischen Chemie das tiefe Geheimnis des Lebens. Schon früh beschäftigte sich der Menschegeist damit, das Lebendige vom nicht Lebendigen abzugrenzen. Er kam zu der Einsicht, daß die charakteristischen, unbedingt erforderlichen Merkmale eines lebendigen Wesens sind: Die Fähigkeit der Ernährung, der Atmung, des Wachstums, der Fortpflanzung, und — mit gewissen Einschränkungen — der Bewegung. Aber der Mechanismus dieser Erscheinungen war bis in die moderne Zeit hinein ein *Noli me tangere* für die exakte Forschung, oder wenigstens ein Gebiet, worin der Forscher zum Träumer wurde, der über dem Wunderbaren hindämmerte, im Bann eines mystischen Etwas, das den Dingen ein eigenes, den Erscheinungen der nichtorganisierten Natur fremdes Gepräge gab. Auch die Jatrochemiker, die sich im 16. und 17. Jahrhundert mit dem Studium der Lebensprozesse befaßten, waren von diesem Bann nicht frei.

Nichtsdestoweniger haben jene tiefgründigen Forscher den Boden geschaffen für unsere heutigen Vorstellungen.

Es war der Riesengeist eines Paracelsus, in welchem zuerst die grandiose Idee aufstieg, daß den Lebensvorgängen chemische Prozesse zugrunde liegen, und in abgeklärterer Form wurde diese selbe Idee von den späteren Jatrochemikern, von van Helmont und Sylvius, verfochten.

Aber schon in jener frühen Epoche war wohl dunkel herausgefühlt worden, was die moderne Zeit klar erkannte:

Die chemischen Prozesse, die sich in den Organismen vollziehen und in innigster Beziehung zu deren Lebensäußerungen stehen, verlaufen unter Bedingungen, bei denen sie außerhalb des Organismus nicht vor sich gehen.

Der lebendige Organismus verfügt also über eigenartige, ihrem

Wesen nach zunächst rätselhaft erscheinende Hilfskräfte, die der Phantasie des Forschers ein weites Feld der Betätigung boten.

Dementsprechend kleidete Paracelsus, im Sinne der verworrenen und phantastischen Anschauungen der damaligen Zeit, seine richtigen Beobachtungen in ein mystisches Gewand. Er stellte sich vor, daß die Verdauung z. B. durch die Mithilfe eines Molekulardämonen, des sog. Archeus, zustande komme.

Nicht viel weniger mystisch als dieses anthropomorphe Gebilde des Paracelsus, welches die Verdauung befördern sollte, ist die Vorstellung von der „Lebenskraft“, eine Vorstellung, die lange als wissenschaftliches Dogma hingenommen wurde.

Alle Substanzen, welche im Organismus entstehen, sollten ihre Existenz einer diesem eigentümlichen, besonderen Kraft — eben der Lebenskraft — verdanken. Kein Agens irgendwelcher Art sollte imstande sein, die Funktion der Lebenskraft zu übernehmen; und daher setzt diese Theorie voraus, daß es unmöglich sei, Substanzen, welche der Organismus bildet, außerhalb desselben durch chemische Umsetzungen zu erzeugen.

Erst im Jahre 1828 erhielt die Lebenskrafthypothese den Todesstoß, als es Wöhler gelang, auf künstlichem Wege den Harnstoff zu synthetisieren, von dem man bis dahin geglaubt hatte, daß nur dem Organismus das Geheimnis seiner Darstellung bekannt sei. Seither hat sich eine Synthese der dem Organismus eigenen Substanzen an die andere gereiht, so daß heute ein Versuch, die Hypothese von der Lebenskraft wieder in ihre früheren Rechte und Ehren einzusetzen, fast hoffnungsloser erscheint, als die wissenschaftlich abgetanen Versuche der Alchimisten, wertlose Metalle in Gold zu verwandeln.

Weit mehr Positives als die Lebenskrafthypothese hat eine Auffassung für die Wissenschaft geleistet, die der große Jatrochemiker Sylvius vertreten hat. Seiner Zeit weit vorausseilend, erkannte er, daß die Verdauung, die er als gewöhnlichen chemischen Prozeß definierte, in bestimmter Weise beeinflusst wird durch den Magen- und Pankreassaft, sowie durch den Speichel. Die Hilfskräfte, die der Organismus zum Zustandekommen der lebensnotwendigen chemischen Reaktionen heranzieht, hatten damit für einen Hauptbestandteil des Ernährungsvorgangs, die Verdauung, bestimmtere Gestalt gewonnen. Nicht ein Molekulardämon wie der Archeus, nicht ein nebelhafter Begriff, wie der der Lebenskraft, waren nach Sylvius die Beförderer der vitalen Reaktionen, sondern ein materielles, faßbares Etwas, wie es in den erwähnten tierischen Sekreten vorliegt.

Was war nun dieses materielle, faßbare Etwas?

Schon das Altertum hatte den Begriff der „Fermentatio“ geschaffen, wie er den Jatrochemikern, besonders Sylvius, geläufig war, und das die Fermentatio bedingende Agens erhielt dementsprechend den Namen „Ferment“. Doch erst dem 19. Jahrhundert war es vorbehalten, diesen Begriff zu klären und an die Lösung der neuen Rätsel heranzutreten, die sich der Forschung auftaten. Wenn es nun auch während des 19. Jahrhunderts gelang, aus den tierischen und pflanzlichen Säften, die eine bestimmte Wirkung zeigten, das betreffende wirksame Prinzip zu gewinnen, so erwies sich dieses doch alsbald von so seltsamer Natur, daß die Forschung auch zur Stunde noch auf diesem Gebiet nicht aus den Ueberraschungen herauskommt.

Man hielt die Fermente lange Zeit ganz allgemein für Eiweißkörper, denn die Substanzen, an welchen die fermentative Wirkung haftet, gaben deutlich die Eiweißreaktionen¹⁾. Aber bei manchen Fermenten hat sich im Lauf der Jahre die eigentümliche Tatsache herausgestellt, daß diese merkwürdigen Substanzen, wenn sie anhaltenden Reinigungsoperationen unterworfen werden, mehr und mehr ihren Eiweißcharakter verlieren²⁾. Es sind Fermentpräparate bekannt, die keine Spur einer Eiweißreaktion mehr zu geben vermögen³⁾ und die doch nicht weniger wirksam sind, als die eiweißhaltigen ungereinigten Produkte. Jeder Anhaltspunkt über die Zusammensetzung dieser chemischen Fragezeichen zergeht einem also gleichsam unter den Händen, sobald man sich bemüht, die reinen Substanzen zu gewinnen. Ja, daß es sich überhaupt um Substanzen handelt, können wir noch nicht einmal als allgemein anerkannt betrachten, — ist doch vor knapp anderthalb Jahrzehnten erst von einem skandinavischen Forscher, dann von Arthus⁴⁾ die Behauptung aufgestellt worden, die Fermente seien keine Stoffe, sondern nur „Eigenschaften“. Wenn wir auch einen derartigen revolutionären Standpunkt ablehnen und an der materiellen Natur der Fermente festhalten wollen, so müssen wir doch Bunge⁵⁾ recht geben, wenn er sagt: „Die Fermente hat wahrscheinlich noch niemand gesehen.“

¹⁾ Siehe hierüber Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, 4. Aufl., Bd. I, Leipzig 1913, S. 26.

²⁾ Ebenda S. 27.

³⁾ In eiweißfreiem Zustande ist ein Amylasepräparat von Fränkel u. Hamburg, Hofmeisters Beitr. 8 (1906) 399, erhalten worden.

⁴⁾ Arthus, Zentrabl. f. Physiol. 10 (1896) 225.

⁵⁾ Bunge, Lehrb. d. physiol. Chem., 4. Aufl., 1898, S. 171.

Wir kennen tatsächlich nichts anderes als ihre Wirkung. Diese Wirkung ist so überraschend und sie kommt doch so fabelhaft geringen Mengen zu, daß es begreiflich erscheint, warum eine Anzahl Forscher dazu gekommen sind, die materielle Natur der Fermente überhaupt in Abrede zu stellen.

Fast könnte man nach dem Gesagten versucht sein, in den Fermenten nichts weiter zu erblicken als ein Surrogat für die Lebenskraft, das vor deren mysteriösem Charakter nichts voraus hat. Man könnte glauben, die Fermente seien nur den lebenden Wesen eigentümliche, sonderbare Hilfskräfte, die keinerlei Analogon in der unbelebten Natur besäßen. Dies ist jedoch durchaus nicht der Fall.

Es ist das große Verdienst von Berzelius¹⁾, daß er eine tiefere innere Wesensverwandtschaft erkannt hat zwischen den Wirkungen der Fermente und einer Anzahl anorganischer Stoffe. Im Jahre 1836 stellte er die zu seiner Zeit bekannten Fälle zusammen, wo eine chemische Reaktion, gleichviel welcher Art, durch die Gegenwart einer fremden Substanz „hervorgerufen“ wird, ohne daß diese letztere nach Ablauf der Reaktion irgendwelche Veränderung zeigt. Die Stoffe, welche in dieser eigenartigen Weise wirksam sind, nannte Berzelius „Katalysatoren“, und die durch diese hervorgerufenen Reaktionen „Katalysen“. Der Begriff der Katalysatoren deckt sich, wie im *Allgemeinen Teil* ausgeführt worden ist, mit einem anderen, den Mitscherlich²⁾ kurz vorher aufgestellt hatte, um die Beeinflussung auszudrücken, welche die konzentrierte Schwefelsäure auf den Alkohol bei dem Prozeß der Aetherbildung ausübt. Er bezeichnete die Schwefelsäure als Kontaksubstanz, indem er damit zum Ausdruck bringen wollte, daß dieselbe nur durch ihre Gegenwart, durch die bloße Berührung mit dem Reaktionsgemisch, wirksam sei.

Andere, zu Berzelius' und Mitscherlichs Zeiten bekannte Katalysen waren: Die Oxydation der schwefligen Säure zu Schwefelsäure in Gegenwart von Stickoxyden³⁾ oder Platin⁴⁾, die Entzündung

¹⁾ Berzelius, vgl. Berzelius Jahresber. d. Chem. 1836, 237 ff.

²⁾ Mitscherlich, Ann. d. Physik [2] 31 (1834) 273, 51 (1841) 108; Ann. Chem. 40 (1841) 207, 44 (1842) 186; Monatsh. d. königl. Akad. d. Wiss., Dezember 1841.

³⁾ Siehe Literatur über den Bleikammerprozeß bei Woker, Die Katalyse, Bd. XI/XII der Samml. d. chem. Analyse, Stuttgart 1910, S. 119 ff.

⁴⁾ Peregrine Phillips, Schweigg. Jahrb. 24 (1828) 412; engl. Pat. Nr. 6096, 1831; Döbereiner, Pogg. Ann. 24 (1832) 609; Schweigg. Journ. 65 (1832) 443.

des Wasserstoffs bei Berührung mit Platin¹⁾, auf welches Prinzip Döbereiner²⁾ ein Feuerzeug gegründet hatte, die Oxydation des Alkohols zu Essigsäure³⁾ durch das nämliche Agens; die Zersetzung des Wasserstoffperoxyds unter dem Einfluß von Platin und anderen Edelmetallen⁴⁾, sowie die Verzuckerung der Stärke durch Säuren⁵⁾.

Die Alkoholoxydation, die Wasserstoffperoxydzersetzung und die Zuckerbildung aus Stärke werden gerade so, wie durch die betreffenden anorganischen Katalysatoren, auch durch gewisse Fermente beeinflusst. So wird Alkohol durch ein Oxydationsferment der Essigsäurebakterien oxydiert⁶⁾; das Wasserstoffperoxyd zerfällt unter dem Einfluß der in allen Organismen enthaltenen Wasserstoffperoxyd spaltenden Fermente — der Katalasen⁷⁾ — und die Stärke wird in den Pflanzen und außerhalb derselben durch ein saccharifizierendes Ferment, die Diastase, verzuckert⁸⁾.

Die analoge Wirkung war also für Berzelius eine Veranlassung, alle diese ganz verschiedenartigen Körper durch die eine gemeinsame Definition als Katalysatoren zusammenzuschließen.

Die Fermente repräsentieren demnach nichts anderes als eine Untergruppe der Katalysatoren⁹⁾ — und als daher Ostwald zu Anfang der neunziger Jahre des vorigen Jahrhunderts ein grundlegendes neues Moment in die Definition der Katalyse einführte, wurden auch die Fermente dadurch betroffen, und die katalytischen Reaktionen des Organismus wurden somit in den Bannkreis der modernen physikalischen Chemie gezogen.

Gemäß Ostwalds Definition¹⁰⁾ versteht man unter Katalyse die

¹⁾ Literatur *Allg. Teil*, S. 20, 22, 27, 28.

²⁾ Döbereiner, Schweigg. Journ. 38 (1823) 321, 39 (1823) 159.

³⁾ Derselbe, Literatur *Allg. Teil*, S. 21, Fußnote 6.

⁴⁾ Thenard, Mémoires de l'acad. des sciences 3 (1818) 385; Ann. Chim. Phys. [2] 9 (1818) 96.

⁵⁾ Literatur siehe *Allg. Teil*, S. 6, 12 ff.

⁶⁾ Siehe hierüber Oppenheimer, loc. cit. Bd. II, 4. Aufl., 1913, S. 829 ff.

⁷⁾ Thenard, loc. cit. Fußnote 4; siehe Literatur bei Oppenheimer, vorige Fußnote, S. 848 ff.

⁸⁾ Payen u. Persoz, Journ. Chim. Med. April (1833) 208, Juni (1833) 359; Ann. Chim. Phys. [2] 53 (1833) 73, 56 (1834) 337, 60 (1835) 441; Journ. f. prakt. Chem. 4 (1835) 288.

⁹⁾ Vgl. auch Taylor, Journ. of Biol. Chem. 8 (1910) 503, der erst vor wenig Jahren betont hat, daß zwischen Katalysatoren und Enzymen kein prinzipieller Unterschied besteht.

¹⁰⁾ Ostwald, siehe sein Referat über eine Arbeit von Stohmann, Zeitschr. f. physik. Chem. 15 (1894) 705; Lehrb. d. allg. Chem., 2. Aufl. [1] 2 (1893) 515.

beschleunigung eines langsam verlaufenden chemischen Vorgangs durch die Gegenwart eines fremden Stoffes.

Ein Katalysator wäre demnach nicht ein Agens, welches instande ist, eine an und für sich nicht verlaufende chemische Reaktion hervorzurufen, wie dies eben Berzelius annahm, sondern es vermöchte der Katalysator nur einen selbstverlaufenden Vorgang zu beschleunigen. Dabei kann allerdings, wie gerade bei vielen fermentativen Prozessen, der unkatalysierte Vorgang so langsam verlaufen, daß er in beobachtbarer Zeit nicht wahrgenommen wird, und bei Zusatz des Katalysators wird daher in solchen Fällen der Eindruck vorgetäuscht, als ob derselbe die Reaktion erst veranlaßt habe.

Welche Bedeutung der Berücksichtigung der Geschwindigkeit in der Definition der Katalyse zukommt, würde schon allein der Umstand zeigen, daß durch den Vergleich der Geschwindigkeit der katalysierten und der nicht katalysierten Reaktion der Wissenschaft ein Mittel an die Hand gegeben ist, die Menge irgend eines Katalysators zu bestimmen, denn die Geschwindigkeit eines Reaktionsverlaufes wächst mit der Quantität des vorhandenen Katalysators und zwar meist angenähert proportional derselben¹⁾. So z. B. gibt die Geschwindigkeit der Wasserstoffperoxydzersetzung durch Blut ein Maß für die Katalasemenge, welche die betreffende Blutprobe enthält. Daß eine solche Bestimmung der Wasserstoffperoxydzersetzungs-fähigkeit des Blutes nicht allein theoretisch interessant, sondern auch praktisch bedeutungsvoll sein kann, hat, um ein Beispiel herauszugreifen, eine Untersuchung von Ad. Jolles²⁾ gezeigt. Aus dieser geht hervor, daß der Katalasegehalt des menschlichen Blutes bei einer Anzahl Krankheiten eine starke Reduktion gegenüber der Norm erfährt. Das Blut Krebskranker vermag, nach Jolles' Beobachtungen, das Wasserstoffperoxyd am wenigsten zu zersetzen, aber auch bei Tuberkulösen und Leukämischen besitzt das Blut eine viel geringere Zersetzungs-fähigkeit gegenüber Wasserstoffperoxyd als beim normalen Menschen. Wichtig ist ferner, daß der Wirkungswert von Fermentpräparaten, die sich im Handel befinden, auf diese Weise festgesetzt werden kann. So ergibt die Spaltungsgeschwindigkeit von Eiweiß den Wirkungswert eines Pepsins, die Verzuckerungsgeschwindigkeit von Stärke den Wirkungswert eines Diastasepräparates usw.

Nicht immer besteht jedoch Proportionalität zwischen der Wir-

¹⁾ Siehe Literatur hierüber im *Allg. Teil*, S. 140 ff.

²⁾ Ad. Jolles, Münchener med. Wochenschr. 47 (1900) Nr. 6; Charité-Analen 25 (1901) 85; Jolles u. Oppenheimer, Virchows Archiv 180 (1905) 185.

kung eines Katalysators und seiner Menge. Gerade die Fermente neigen zu Abweichungen von den Gesetzen der gewöhnlichen Katalysatoren. Es wäre jedoch ungerechtfertigt, wollte man hieraus einen prinzipiellen Unterschied konstruieren, denn die Abweichungen, auf die wir an dieser Stelle nicht näher eingehen können, rühren bei den Fermenten im allgemeinen her von deren kolloider Beschaffenheit und sind demnach sekundären Ursprungs. Es genügt sehr oft, einen anorganischen Katalysator wie das Platin in kolloide Form zu bringen, um auch bei ihm die nämlichen Eigentümlichkeiten zu konstatieren, wie bei den Fermenten. Auch sonst zeigen die kolloiden Lösungen der Edelmetalle die weitgehendste Analogie mit den Wasserstoffperoxyd zersetzenden Fermenten.

Diese „anorganischen Fermente“ (Bredig) vermögen fast auf der ganzen Linie durch dieselben Stoffe vergiftet zu werden, wie die natürlichen Katalasen¹⁾, und zwar erstreckt sich die Analogie auf alle Details in der Einwirkungsart des Giftes. So ist bei der Blutkatalase wie beim kolloiden Platin die Vergiftung bedeutend schwerer, wenn man erst Blausäure oder Schwefelwasserstoff und dann das Wasserstoffperoxyd auf die Fermentlösung einwirken läßt, als wenn die umgekehrte Reihenfolge eingehalten wird.

Wie es anorganische Modelle für diese und andere Fermente gibt, so kann man auch unter sehr einfach gebauten organischen Körpern solche Modelle finden. So vermag der Formaldehyd in Gegenwart von Wasserstoffperoxyd oder ozonisiertem Terpentinöl die wichtigsten Peroxydasereaktionen (Guajakreaktion, Benzidinreaktion, Zersetzung von Jodkalium, Indigoentfärbung usw.) zu geben, zugleich, ähnlich den Katalasen, mit Wasserstoffperoxyd unter Gasentwicklung zu reagieren und wahrscheinlich als spaltendes Agens gegenüber Stärke und vielleicht auch Eiweißkörpern zu fungieren. Ferner vermag der Formaldehyd den Hydrogenasen analog Schwefel in Schwefelwasserstoff überzuführen²⁾.

Die aus dem Angeführten hervorgehende große Analogie zwischen den Katalysatoren der unbelebten Natur und den Fermenten schließt nun als solche allerdings noch keineswegs eine Erklärung der Wirkung dieser letzteren in sich. Ist doch der Einfluß auch der einfachsten Katalysatoren in sehr vielen Fällen noch vollständig in Dunkel gehüllt. Immerhin existieren eine Anzahl Erklärungen, die für diese oder jene Katalyse einen hohen Grad von Wahrscheinlichkeit besitzen. Ins-

¹⁾ Senter, Zeitschr. f. physik. Chem. 44 (1903) 247; 51 (1905) 673.

²⁾ Siehe Näheres hierüber in den betreffenden Kapiteln dieses Bandes.

besondere ist die Theorie der Zwischenreaktionen außerordentlich fruchtbar.

Seit Clément und Désormes¹⁾ im Jahre 1806 diese Theorie aufgestellt haben, um die Rolle des Salpeters bei der Schwefelsäure-darstellung zu erklären, ist dieselbe immer wieder von den verschiedensten Seiten hervorgeholt worden.

Nach der Zwischenreaktionshypothese beschränkt sich der chemische Vorgang nicht auf die Wechselwirkung der Reagentien (wobei der Katalysator von Anfang bis zu Ende der Reaktion in völlig unverändertem Zustand im Reaktionsgemisch vorhanden wäre), vielmehr beteiligt sich der Katalysator an dem chemischen Prozeß, indem er sich mit einem der Reagentien unter intermediärer Bildung eines rasch reagierenden Zwischenproduktes umsetzt. Zum Schluß findet sich dann der im weiteren Verlauf der Reaktion regenerierte Katalysator neben dem Umsetzungsprodukt quantitativ und qualitativ unverändert vor.

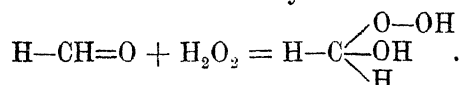
Einfache Beispiele solcher Zwischenreaktionskatalysen finden sich im *Allgemeinen Teil* eingehend beschrieben.

Als Zwischenreaktionskatalysen sind auch die Oxydationen im Organismus zu betrachten. Dieser letztere besitzt in seinen Oxydationsfermenten, den sog. Oxydasen, ein Mittel, um auch solche Substanzen zu verbrennen, welche außerhalb des Organismus nur bei hohen Temperaturen durch Sauerstoff angreifbar sind.

Die die Oxydationsvorgänge katalysierenden Agentien — eben die Oxydasen — üben nun aller Wahrscheinlichkeit nach ihre Wirkung durch intermediäre Bildung von Peroxyden aus. Diese sind es, welche die energischsten Oxydationen auszuüben vermögen, wobei zugleich die ursprünglichen Oxydasen wieder regeneriert werden können. Dieselben vermögen dann von neuem Sauerstoff auf die gerade vorhandenen schwer verbrennlichen Substanzen zu übertragen, sich dabei wieder zu regenerieren usw. Der Vorgang gelangt nicht eher zur Ruhe, als bis die Oxydation des betreffenden Stoffes vollendet ist. Ohne den wunderbar sinnreichen Mechanismus der fermentativen Sauerstoffübertragung würde der aerobe Organismus kaum imstande sein, viele Verbindungen, die ihm durch die Nahrung zugeführt werden, sowie sein eigenes aufgespeichertes Reservenährmaterial, völlig zu verarbeiten, d. h. in Wärme und Arbeit umzusetzen und sich von schädlichen Nebenprodukten und Endprodukten des Gewebestoffwechsels zu befreien.

¹⁾ Clément u. Désormes, Ann. Chim. Phys. 59 (1806) 329.

Daß diese für die Erhaltung des Lebens außerordentlich wichtige Beeinflussungsart keine den Oxydations- oder Atmungsfermenten allein zukommende Eigentümlichkeit ist, zeigt der Umstand, daß auch Körper von bekannter einfacher Konstitution existieren, welche sich gegenüber schwer angreifbaren Substanzen nicht anders verhalten als die Oxydasen. Als ein solches Modell für die Wirkungsart dieser letzteren betrachtet Bach ¹⁾ den Benzaldehyd ²⁾, in dessen Gegenwart Indigoblau an der Luft unter Entfärbung oxydiert wird, gerade so, wie durch die natürlichen Oxydationsfermente, und von den Peroxydaseeigenschaften des Formaldehyds war schon die Rede. Das stark oxydierend wirkende, peroxydartige Zwischenprodukt kommt beim Benzaldehyd durch Addition eines Sauerstoffmoleküls an zwei Benzaldehydmoleküle zustande, oder wie die Verfasserin zeigte, beim Formaldehyd und beim frisch destillierten Benzaldehyd durch Addition von Wasserstoffperoxyd oder einem anderen Peroxyd an die Aldehydgruppe:



Die meisten natürlichen Oxydasen sind mangan- oder eisenhaltig, und es steht nach Bertrand ³⁾ dieser Metallgehalt in engster Beziehung zu den oxydierenden Fähigkeiten der betreffenden Oxydase.

Wird dem Oxydationsferment des Lackbaumes — der Laccase — die sich übrigens auch in anderen Pflanzen findet, ihr Mangangehalt entzogen, so wird das Oxydationsvermögen dieses Fermentes auf ein Minimum herabgesetzt. Erst nach künstlicher Zugabe von Mangan erhält die Laccase ihre frühere Wirksamkeit wieder.

Der Einfluß des Mangans, das man als „Koferment der Laccase“ bezeichnet, ist jedoch nur ein sekundärer. Es kommt ihm nach Bach (loc. cit.) die Aufgabe zu, die primären Oxydationsprodukte der Laccasetätigkeit weiter zu oxydieren. Unterbleibt diese sekundäre Wirkung nach Manganentzug, so häufen sich die Endprodukte der primären Oxydation in solchem Maße an, daß dadurch das Fortschreiten der Reaktion nach dem Massenwirkungsgesetz gehemmt wird ⁴⁾. Die

¹⁾ Bach, Ber. d. chem. Ges. **43** (1910) 364.

²⁾ Der frisch überdestillierte Benzaldehyd ist jedoch noch peroxydfrei und daher zur direkten Sauerstoffübertragung nicht befähigt, wohl aber vermag er, wie die natürlichen Peroxydasen, Sauerstoff aus peroxydischer Quelle, z. B. aus Wasserstoffperoxyd, zu übertragen (siehe im folgenden, sowie den Abschnitt über Oxydasen).

³⁾ Literatur *Allg. Teil*, S. 548 u. 549.

⁴⁾ Vgl. Woker, Probleme der katalytischen Forschung, Leipzig 1907.

Oxydase erleidet so lange eine Inaktivierung, bis ein erneuter Mangan-zusatz die Endprodukte des primären Oxydationsvorganges aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt. Ist dies geschehen, so setzt die Reaktion von neuem ein.

Bei der Atmung im weitesten Sinn, d. h. bei allen unter Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabspaltung im Organismus verlaufenden Vorgängen, besitzen wir also in der Zwischenreaktionstheorie eine mit den Tatsachen im Einklang stehende Erklärung für die reaktionsbegünstigende Wirkung der katalysierenden Oxydationsfermente — wenigstens in den großen Zügen — in den Details harrt noch mancher dunkle Punkt der Aufklärung.

Andere Verhältnisse liegen vor bei der Unzahl verschiedenartiger Spaltungen, welche im Organismus vonstatten gehen. Auch hier handelt es sich um Reaktionen, die außerhalb des Organismus nur unmerklich langsam verlaufen. Die unter Wasseraufnahme vor sich gehende Aufspaltung der Eiweißkörper, der Kohlenhydrate und Fette der Nahrung zu den einfachen Bausteinen, aus welchen der Organismus wieder seine Moleküle zusammensetzt, vollzieht sich dagegen rasch in Gegenwart bestimmter, die Wasseraufnahme begünstigender Fermente, wie sie im Verdauungskanal bei Bedarf zur Verfügung stehen. Die große Frage ist jedoch, in welcher Weise diese Fermente ihre beschleunigende Wirkung auf die Wasseraufnahme der genannten Verbindungen ausüben. Sie scheinen imstande zu sein, die Spaltung des Wassers in seine beiden Ionen, das Wasserstoffion und das Hydroxylion, zu befördern¹⁾. Denn diese Ionen sind es, welche getrennt in die Spaltstücke des sich hydrolysierenden Stoffes eingehen.

Schon vor der Aufstellung der elektrolytischen Dissoziations-theorie durch Arrhenius haben so scharfsinnige Forscher wie M. Traube²⁾, Hüfner³⁾ und Nencki⁴⁾ die Wirksamkeit der hydrolysierenden Fermente in einer Vermehrung der Spaltung des Wassers in H und OH gesucht. An die Hauptfrage aber, warum die Fermente und in ganz analoger Weise die Wasserstoffionen einen zersetzenden Einfluß auf das Wasser ausüben, sind weder die genannten noch spätere Forscher herangetreten.

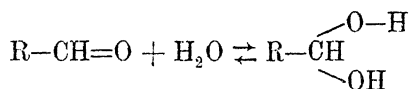
¹⁾ Euler, Oefvers K. Vetensk. Akad. Förh. 56 (1899) 465; Zeitschr. f. physik. Chem. 32 (1900) 348; Kullgren, siehe Literatur *Allg. Teil*, S. 98.

²⁾ M. Traube, Theorie der Fermentwirkungen, Berlin 1858: Fehlings Handwörterbuch 3 (1878) 220.

³⁾ Hüfner, Journ. f. prakt. Chem. [N. F.] 5 (1872) 372

⁴⁾ Nencki, siehe die Lehre von den fermentativen Gerinnungserscheinungen, Dorpat 1876; Fehlings Handwörterbuch 3 (1878) 220.

Auch hier ist eine Erklärung durch Zwischenreaktionen möglich, wenngleich nur Stützpunkte für diese Auffassung vorhanden sind. Es kann das Ferment Wasser unter Bildung eines unbeständigen Hydrates addieren, das als Wasserüberträger wirkt, indem es die Elemente des aufgenommenen Wassers H und OH an das hydrolysierbare Substrat abzugeben vermag. Daß die Wasseraufnahme auf dem Umweg eher erfolgt als auf dem direkten Weg, würde dem Umstand zuzuschreiben sein, daß die Elemente des Wassers H und OH getrennt vom Ferment addiert und in dieser Form auch wieder abgegeben werden. Das Ferment würde in dieser Weise tatsächlich als dissoziationsvermehrendes Agens gegenüber dem Wasser fungieren. Als Trägerin der intermediären Wasseraddition kommt die schon vorher erwähnte Aldehydgruppe, die ja den Fermenten schon lange, gestützt auf andere Erwägungen, zugeschrieben worden ist, in Betracht. Wie das Chloral ein Hydrat, das Chloralhydrat, bildet, so würde dies auch bei jedem anderen Aldehyd möglich sein, nur mit dem Unterschied, daß es sich bei solchen nach der Gleichung



gebildeten Hydraten fast immer um unbeständige Körper handelt, die ebenso leicht im Sinne des Pfeils von rechts nach links zerfallen, als sie sich bilden und damit einem gleichzeitig anwesenden Substrat die Spaltstücke H und OH des Wassers darzubieten vermögen, deren das Substrat zu seiner hydrolytischen Spaltung benötigt. Mit einer solchen Auffassung wäre auch für den Gedanken eines inneren Zusammenhangs zwischen hydrolysierenden Fermenten und Oxydasen wiederum Boden gewonnen, für einen Gedanken, der den Klassikern auf dem Gebiet der Fermentforschung, vor allem Schönbein, ebenso selbstverständlich erschien, wie den Modernen, seit Jacobsens später erörterter Untersuchung, das Gegenteil. Ist die Aldehydgruppe zu hydrolysierenden Wirkungen befähigt, dann müssen sich unter den Aldehyden, analog den Peroxydasemodellen, auch Diastasemodelle z. B. finden lassen. In der Tat zeigte nun der Formaldehyd sowohl bei den Vorversuchen der Verfasserin, wie bei den eingehenden Versuchen, welche H. Maggi¹⁾ im Laboratorium für physikalisch-chemische Biologie der Universität Bern hierüber angestellt hat, daß unter geeigneten Bedingungen die wichtigsten Kriterien einer Stärkespaltung vorhanden sind. So werden Stärkekleisterplatten oder Stärke in Mettschen Ka-

¹⁾ H. Maggi, Fermentforschung 2 (1919) 304—448.

pillaren analog der ersten Phase der diastatischen Stärkespaltung verflüssigt, und Stärkekörner irgendwelcher Provenienz werden vom Formaldehyd unter denselben Erscheinungen (Sprünge, Arrosionen, partielle und schließlich gänzliche Lösung) angegriffen, wie von der Diastase, wobei sich hier wie dort bei Jodzusatz das nämliche, mit dem Angriff parallelgehende Farbenbild der Dextrinisierung am mikrochemischen Präparat — wie makrochemisch an Stärkelösungen — ergibt. So wurden auch charakteristische Zuckerreaktionen, wie die Moore-Hellersche Reaktion, die Karamelisierung, und bei sofortiger Anstellung des Versuchs nach der Herstellung der Gemische von Formaldehyd und Weizenstärkelösung oder nach längerer Zeit mikrochemisch am Weizenstärkekorn die Reduktion der Fehlingschen Lösung, die Reduktionsproben nach Lintner und Bang erhalten. Ferner konnten die typischen gelben Kristallrosetten eines Osazons (Schmelzpunkt 180 bis 182°) aus verschiedenen Fraktionen der der fraktionierten Dialyse unterworfenen Dialysate selbst und nach der Ausfällung höhermolekularer Anteile durch absoluten Alkohol (aus den mit Wasser aufgenommenen Verdunstungsrückständen jener Fraktionen) aus dem Verdunstungsrückstand des alkoholischen Filtrates — in welches nur Zucker übergeht — mit Phenylhydrazinchlorhydrat und Natriumazetat isoliert werden. Endlich konnte auch analog der Diastasewirkung eine Volumenabnahme der Formaldehydstärkegemische festgestellt werden, die während der ersten halben Stunde des Versuchs größer ist als die durch die Formaldehydpolymerisation allein veranlaßte, und die Anfangswerte bei der Viskositätsbestimmung nach Heß waren beim Gemisch niedriger als der arithmetische Mittelwert der Komponenten. Trotzdem bei längerer Ausdehnung des Versuchs der Nachweis von Stärkespaltprodukten immer schwieriger wird, teils infolge einer Bindung des Formaldehyds an die Spaltprodukte, wodurch diese in eine maskeerte Form übergehen, teils durch das Ueberwiegen einer entgegengerichteten Reaktion, die zu den nicht wieder spaltbaren, nicht reduzierenden Reversionsdextrinen führt — wodurch sich negative Resultate von anderer Seite erklären — scheint der Verfasserin, daß das Bild als Ganzes kaum anders als durch eine Stärkespaltung seine Deutung finden kann. Teilerscheinungen könnten zwar auch durch einen Bindungsvorgang veranlaßt sein, wie die Verfasserin selbst in ihrer ersten Vorpublikation betont hat. v. Kaufmann und andere später eingehender gewürdigte Autoren haben im Gegensatz zu der Auffassung der Verfasserin die Ansicht vertreten, daß es sich überhaupt nur um eine solche Bindung handelt.

Eine andere Frage ist dann ferner, ob sich auch andere fermentative Spaltungen auf demselben Wege vollziehen können. Anhaltspunkte hierfür gibt die Tatsache, daß trübe Rizinlösungen durch Formaldehyd ähnlich wie durch Pepsin eine Aufhellung erfahren, daß Karminfibrin in Formalinsalzsäure — von allerdings stärkerer Konzentration als sie für die Pepsinwirkung in Frage kommt — und Spiritblau oder Fibrin in Formalin einen stärkeren Farbstoffaustritt erfährt als durch gleich konzentrierte Salzsäure bzw. Ameisensäure allein; daß bisweilen auf weichgekochten Eiweißplatten eine tiefere Delle wahrgenommen werden kann, wenn 1 Tropfen normaler Salzsäure + 1 Tropfen Formalin auf die Platte gebracht wird, als wenn 1 Tropfen derselben Salzsäure mit 1 Tropfen Wasser zur Einwirkung auf die Platte kommt, während Formaldehyd allein überhaupt keine Delle hervorruft. Andere Pepsinermittlungsmethoden versagen dagegen wegen der Simultanreaktion des Formaldehyds mit den NH_2 des Eiweiß. Am weitesten scheint die Analogie bei dem, ähnlich dem Formaldehyd, starken Hemmungswirkungen unterworfenen, eiweißspaltenden Ferment pflanzlicher Herkunft, dem Papayotin, zu gehen. Wie dieses nur beim raschen Aufkochen, nicht aber bei längerem Stehen bei Brutschranktemperatur eine Peptonisierung von Hühneralbumin oder Serumeiweiß bewirkt, so gelingt es häufig auch beim sehr raschen Aufkochen von Formaldehyd mit den nämlichen Eiweißkörpern, bei sofortiger Anstellung der Biuretprobe, eine rötliche, auf die Gegenwart von Peptonen deutende Farbennuance zu erhalten.

(Beiläufig sei erwähnt, daß beim raschen Aufkochen von festem Hühneralbumin mit Formaldehyd und Filtration vom ungelösten Rückstand eine kristallinische Ausscheidung in den Filtraten, die sich nach etwa 14tägigem Stehen als aus mikroskopischen Kristallrosetten zusammengesetzt erwies, erhalten wurde¹⁾. Trotzdem die Kristalle denjenigen aus Tyrosinvergleichspräparaten ähnlich sahen und am eingedunsteten Präparat außerdem stark lichtbrechende, leucinarartige Kugeln zu erkennen waren, mahnen die sphärokristallinischen Ausscheidungen polymerer Formaldehyde zu größter Zurückhaltung bei weiteren Schlußfolgerungen.)

Es könnte also vielleicht auch hier die Aldehydgruppe der Fermente als Trägerin der spaltenden Wirkungen betrachtet werden. Doch ist durchaus nicht gesagt, daß nur die Aldehydgruppe zu solchen Wirkungen befähigt sei. Das nämliche vermag jede Gruppe zu leisten,

¹⁾ Woker, noch nicht veröffentlichte Versuche.

welche wie diese ein unbeständiges Hydrat durch Addition der „Elemente des Wassers“ H und OH liefert, dessen Zerfall in die beiden, im Moment des Freiwerdens getrennten Ionen H^+ und OH^- die Hydrolyse eines zur Addition dieser Ionen befähigten Substrates bewirken kann. Die in Fermenten, namentlich den hochmolekularen Pepsinasen, wohl vielfach ebenfalls vorhandene Aminogruppe könnte also z. B. genau nach demselben Mechanismus wie die Aldehydgruppe Wasser addieren unter Bildung der unbeständigen Ammoniumhydroxydform, welche bei ihrer Rückverwandlung in die Aminogruppe aktives, d. h. in seine Ionen zerfallenes Wasser an das Substrat abzugeben vermag.

Es ist nicht unmöglich, daß eine erweiterte chemische Kenntnis der Natur der Fermente selbst eine Aufklärung auch der soeben gestreiften wichtigen Frage nach der wasserübertragenden Gruppe in jedem einzelnen Falle bringen wird. Dies wäre um so mehr zu begrüßen, als die fermentativen Hydrolysen in der ganzen belebten Natur eine ungemein tiefgreifende Rolle spielen, wie dies das Kapitel über die hydrolysierenden Fermente zeigt. Vorläufig sind wir freilich noch weit von diesem wichtigen Schritt im Gebiet der Fermentforschung entfernt, ist doch die Auffassung, wonach z. B. die Nahrungsverwertung vom hochorganisierten Tier bis hinab zur einfachsten, frei lebenden Zelle nach demselben Grundprinzip durch fermentative Spaltung des Nährsubstrates erfolgt, erst in jüngster Zeit einer jahrzehntelang fast allgemein anerkannten Anschauung entgegengestellt worden.

Dank der fortschreitenden mikroskopischen Technik hatte man während der dreißiger Jahre des vorigen Jahrhunderts in gärenden Materien, vor allem in gärenden Zuckerlösungen, kleinste Lebewesen in großer Zahl entdeckt, und Cagnard de Latour, sowie Turpin¹⁾ zauderten nicht, dieselben mit dem Vorgang der Gärung in direktesten Zusammenhang zu bringen. Sie erklärten die aufgefundenen Zellen als Erreger des betreffenden Zersetzungsprozesses, als „Ferment“.

Diese vitalistische Richtung gewann mehr und mehr an Boden, trotz der energischsten Bekämpfung derselben durch Liebig, welcher seinerseits die Fermente als chemische Substanzen betrachtete, die sich „in einem Zustand werdender Veränderung“ befinden und diese Veränderung auf Körper zu übertragen vermögen, mit denen sie in Kontakt kommen²⁾.

Die größten Triumphe feierte die vitalistische Richtung in der

¹⁾ Turpin, Compt. rend. 9 (1839) Nr. 8; Ann. Chim. 29 (1839) 93.

²⁾ Liebig, Ann. Chem. 30 (1839) 250; Ann. d. Physik [2] 48 (1839) 106; Journ. f. prakt. Chem. 18 (1839) 129 und ebenda [N. F.] 1 (1870) 35.

Auffassung Pasteurs¹⁾, der Gärungs- und Fäulnisprozesse als Lebensäußerungen eines einfachen Lebewesens aus der Klasse der Bakterien oder der niedrigen Pilze betrachtete. So war die alkoholische Gärung nach Pasteur nichts anderes als der Ausdruck der Lebenstätigkeit der zuckerverzehrenden Hefezellen, die der Gruppe der *Sacharomyceten* oder Sproßpilze angehören.

Ähnliche Wirkungen waren nun aber auch bekannt, deren Ursache keineswegs ein Lebewesen war, sondern eine bloße, nicht organisierte chemische Substanz. Hierher gehört die Verzuckerung der Stärke durch die Malzdiastase, die Magenverdauung mit Hilfe des Pepsins, die pankreatische Verdauung mit Hilfe des Trypsins des Pankreas und viele andere Vorgänge von größter Wichtigkeit. Da all diese Reaktionen genau so gut einen fermentativen Charakter trugen wie die erstgenannten, so mußte man unterscheiden zwischen geformten Fermenten, den Lebewesen, und ungeformten Fermenten oder Enzymen, deren Wirkung nicht an den vitalen Träger gebunden war. Für die vitalistische Auffassung der Wirkung geformter Fermente bedeutete dieser Doppelsinn eigentlich schon den Untergang. Denn nun war die Ansicht nicht mehr von der Hand zu weisen, daß auch die Organismen nur vermöge des Gehalts an einem solchen Enzym ihre spezifische Wirkung zu entfalten vermöchten. Bis in die jüngste Zeit hinein glaubte man jedoch, diese Enzyme der geformten Fermente seien untrennbar an ihren lebendigen Träger gebunden und aufs engste mit dessen Lebensprozeß verknüpft.

Da kamen die Arbeiten Buchners²⁾, welcher zeigte, daß sich aus den Hefezellen ein zellenfreier Preßsaft gewinnen läßt, welcher in jeder Beziehung der lebendigen Hefe gleich zu wirken vermag. Damit war zweifellos festgestellt, daß es sich auch bei den geformten Fermenten weder um Lebensprozesse selbst, noch um Substanzen handelt, deren Wirkung von dem Leben ihres Trägers unmittelbar abhängig ist³⁾. Der Begriff des geformten Fermentes hat dadurch

¹⁾ Pasteur, *Ann. Chim. Phys.* [3] 58 (1860) 323.

²⁾ Buchner u. Hahn, *Zymasegärung*, 1903.

³⁾ Nichtsdestoweniger besteht ein Zusammenhang zwischen den fermentativen Substanzen und dem Leben. Man könnte diesem Zusammenhang vielleicht am besten dadurch Ausdruck geben, daß man in Umkehrung der vitalistischen Denkweise, die die Fermentwirkung als Folge- oder Begleiterscheinung des Lebens betrachtet, das Leben definierte als eine Summe von zweckmäßig ineinandergreifenden fermentativen Prozessen. Auch derjenige, der sich einer solchen rationalistischen Auffassung nicht anschließen mag, wird zugeben, daß keine Lebensäußerung existiert, die nicht mit einem fermentativen Vorgang

seine Existenzberechtigung verloren, wollte man nicht, wie man es konsequenterweise tun sollte, auch die höheren Tiere als „geformtes Ferment“ bezeichnen.

Die fermentative Wirksamkeit, die ein Lebewesen, gleichviel welcher Art, auf Stoffe ausübt, mit denen es in Berührung kommt, reduziert sich also unter allen Umständen auf eine chemische Substanz, auf ein „ungeformtes Ferment“ — nach dem vitalistischen Sprachgebrauch — oder Enzym, und wenn wir heute von Fermenten sprechen, so verstehen wir darunter überhaupt nur diese Enzyme, deren Wirkungsprinzip in Verbindung mit dem Organismus, welcher sie erzeugt, und von ihm getrennt, das nämliche ist. Nur in einer Hinsicht unterscheidet sich die Wirkung des isolierten Enzyms von derjenigen, die das sog. „geformte Ferment“, d. h. also, die Verbindung des Enzyms mit seinem vitalen Träger entfaltet. Nur das letztere, das Ferment absondernde Lebewesen als solches, ist befähigt, die Zersetzung eines Substrats vollständig zu Ende zu führen, während das isolierte Enzym nur unvollkommen spaltet¹⁾. Dieser Unterschied ist jedoch nicht in einer Ungleichheit des geformten und des ungeformten Fermentes, gemäß der Auffassung von Pasteur, zu suchen, sondern es wird das verschiedenartige Verhalten einzig und allein durch die divergierenden Nebenumstände bedingt. Gerade so, wie wir dies bei der manganfreien Laccase gesehen haben, kommt es auch hier, bei den isolierten hydrolysierenden Enzymen, zu einer Anhäufung der Spaltprodukte, die dann nach dem Massenwirkungsgesetz den weiteren Verlauf der Substratzersetzung hemmen, und außerdem kommen nach Tammann Bindungen zwischen Ferment und Spaltprodukten in Betracht²⁾. Wirkt dagegen das Lebewesen als solches ein, so nimmt es die durch das Enzym gebildeten, seiner Ernährung dienenden Spaltprodukte sofort in sich auf und entfernt sie dadurch aus dem Reaktionsgleichgewicht. Solange also das betreffende Lebewesen die Spaltprodukte zu verzehren vermag, welche es sich mittels des En-

koordiniert wäre, und der Satz: „Kein Leben ohne Fermente“ wird daher kaum auf sachliche Gegengründe stoßen. Selbst wenn die ursprüngliche Existenz von fermentloser lebendiger Substanz angenommen wird, leuchtet es ein, daß die letztere augenblicklich ihr „Leben“ einbüßen müßte, wenn sie nicht in sich die Fähigkeit einschloße, im Moment ihrer Entstehung die Fermente zu bilden, welche ihre Ernährung, ihre Atmung usw. vermitteln.

¹⁾ Tammann, Zeitschr. f. physik. Chem. 3 (1889) 25, 18 (1895) 428.

²⁾ Tammann selbst macht eine Bindung zwischen Ferment und Spaltprodukten für das Zustandekommen der von ihm als „falsches Gleichgewicht“ bezeichneten Erscheinung verantwortlich. Siehe den *Allg. Teil*. S. 152—157, 257.

zyms aus den Nährstoffen bereitet, kann die Zersetzung des Substrates bis zum vollständigen Aufbrauch desselben fortschreiten.

Auch jede andere mit dem Enzym kombinierte Einrichtung, welche die Eliminierung der hemmenden Zersetzungsprodukte besorgt, vermag, gerade so wie das betreffende enzymerzeugende Lebewesen, einen vollständigen Ablauf der Reaktion zu bedingen.

Schon Payen und Persoz¹⁾ haben im Jahre 1833 für die Umwandlung der Stärke in Zucker unter dem Einfluß der Diastase festgestellt, daß die Verzuckerung eine viel vollständigere ist, wenn der gebildete Zucker durch Gärung entfernt wird. Hier zerstört also die Zymase (das Endoenzym der Hefezellen) das Umsetzungsprodukt, welches unter dem Einfluß der Diastase aus Stärke gebildet worden ist.

Ferner konnte Lindet²⁾ die Maltosebildung weiter treiben durch Bindung der Maltose an Phenylhydrazin.

In ganz analoger Weise läßt sich auch auf physikalischem Wege ein vollständiger Verlauf der Enzymreaktionen erzielen. So ermöglichte Tammann³⁾ bei der Salizinspaltung, in Gegenwart des Emulsins, dem den bitteren Mandeln eigentümlichen Enzymgemisch, eine bedeutend weitergehende Zersetzung durch Ausäthern des entstandenen Saligenins. Sheridan Lea⁴⁾ zeigte, daß die Umwandlung der Stärke durch die Diastase des Speichels rascher und vollständiger verläuft, wenn man die Endprodukte durch Dialyse fortschafft, und Abderhalden⁵⁾ fand bei der fermentativen Spaltung des Glycyl-l-Tyrosins ein regelmäßiges Wiedereinsetzen der Reaktion, sobald sich das hemmende Endprodukt der Spaltung, das Tyrosin, aus der Lösung in fester Form ausschied.

Vermag ein Enzym auf verschiedene Substrate einzuwirken, so läßt sich noch eine andere, hierhergehörige Erscheinung beobachten. Tammann (loc. cit.) zeigte nämlich, daß Emulsin, welches bei der Zersetzung des Glykosids der bitteren Mandeln, dem Amygdalin, nach einer gewissen Zeit durch die angehäuften Spaltungsprodukte in seiner Tätigkeit gehemmt worden ist, damit noch nicht die Fähigkeit eingebüßt hat, auf ein anderes Glykosid, das Salizin, einzuwirken. Die

¹⁾ Payen u. Persoz, Journ. Chim. Med. (1833) April, 208 und ebenda (1833) Juni, 359; Ann. Chim. Phys. [2] 53 (1833) 73, 56 (1834) 337, 60 (1835) 441.

²⁾ Lindet, zitiert nach Bredig, Die Elemente der chemischen Kinetik, Ergebn. d. Physiol. I (1902) 195.

³⁾ Tammann, Zeitschr. f. physik. Chem. 18 (1895) 428.

⁴⁾ Sheridan Lea, Journ. of Physiol. 11 (1890) 226.

⁵⁾ Abderhalden, Lehrb. d. physiol. Chem., 2. Aufl., 1909, S. 631.

Endprodukte der Amygdalinspaltung vermögen eben nur diese letztere, nicht aber die Salizinspaltung zu verhindern.

Die im vorigen besprochene reaktionshemmende Wirkung der Endprodukte fermentativer Reaktionen führt uns nun noch einen Schritt weiter.

Es entsteht hier die Frage, ob bei sukzessive zunehmender Anhäufung der Endprodukte der Punkt der vollständigen Hemmung dauernd erhalten bleibt, oder ob derselbe noch überschritten werden kann, was sich durch ein Umschlagen des Sinnes des Reaktionsverlaufes dokumentieren müßte.

Gemäß der letzteren Auffassung würde also eine Spaltungsreaktion mit zunehmender Anhäufung der Spaltprodukte, nach immer langsamer und langsamer werdendem Verlauf, ganz aufhören und dann in entgegengesetzter Richtung unter Rückbildung der ursprünglichen Moleküle mit immer steigender Geschwindigkeit verlaufen.

Theorie und Tatsachen zwingen zu der letzteren Vorstellung, was sich aus den Ueberlegungen ergibt, die im letzten Kapitel des allgemeinen Teils bei Ableitung des Massenwirkungsgesetzes dargelegt worden sind.

In Worten ausgedrückt besagt das Massenwirkungsgesetz bekanntlich ¹⁾, daß das Produkt der Konzentrationen der Stoffe auf der rechten Seite einer chemischen Gleichung, dividiert durch das Produkt der Konzentrationen auf der linken Seite derselben eine Konstante ist. Da die Konstante unter allen Umständen erhalten bleiben muß, so bedingt jede Vermehrung einer Konzentration im Zähler zugleich auch eine Vermehrung des Produktes der Konzentrationen im Nenner und umgekehrt. Ob eine Reaktion von links nach rechts oder von rechts nach links verläuft, hängt nach den Forderungen des Massenwirkungsgesetzes einzig ab von den Konzentrationen der Stoffe auf der linken und rechten Seite der zugrunde liegenden chemischen Gleichung.

Ueberwiegen in einem gewissen Zeitpunkt die Konzentrationen der Substanzen auf der linken Seite der Gleichung, so muß die Reaktion in diesem Augenblick von links nach rechts verlaufen. Sobald sich aber, gleichviel aus welchem Grunde, die Endprodukte dieser Reaktion, d. h. die auf der rechten Seite der Gleichung stehenden Körper, über ein gewisses Maß angehäuft haben, schlägt der Sinn der Reaktion nach Ueberschreiten des Gleichgewichtszustandes um, so

¹⁾ Guldberg u. Waage, *Études sur les affinités chimiques*, Kristiania 1867; van't Hoff, *Vorlesungen über theoretische und physikalische Chemie*, 1901, S. 181 ff.; Nernst, *Theoretische Chemie*. Stuttgart 1903. S. 427 ff.

daß sich nunmehr der Vorgang von rechts nach links abspielt. Das Massenwirkungsgesetz beherrscht in gleicher Weise sowohl die nicht-katalysierten wie die katalysierten Reaktionen.

Der Katalysator vermag an dem bestehenden Gleichgewichtszustand nichts zu ändern, denn, wie van't Hoff ¹⁾ gezeigt hat, würde eine Verschiebung des Gleichgewichtes durch den Katalysator im Widerspruch stehen zu den Gesetzen der Thermodynamik.

Dieser Befund ist für die Biologie von kaum abzuschätzender Tragweite. Denn die Auffassung der Enzyme als Katalysatoren macht es notwendig, auch für eine Unzahl fermentativer Reaktionen die Forderung der Umkehrbarkeit zu erheben ²⁾.

Wenn wir bisher von spaltenden Fermenten gesprochen haben, so sind wir damit der Doppelfunktion der Fermente nicht gerecht geworden. Es bleibt uns nachzuholen, daß diese Fermente gemäß den Forderungen der Theorie imstande sein müssen, jede praktisch reversible Reaktion in der einen oder anderen Richtung zu beschleunigen. Einzig das Verhältnis der Konzentrationen an den Endpunkten der Reaktionsbahn bestimmt mit der Richtung des Reaktionsverlaufes zugleich den Sinn der Fermentwirkung.

Erst vor zwei Jahrzehnten ist die theoretisch verlangte Umkehrbarkeit der Fermentreaktionen auch experimentell einwandfrei erwiesen worden durch eine schöne Untersuchung von Croft Hill ³⁾, welche die Reversibilität der Maltosespaltung durch Maltase zum Gegenstand hatte. Dieser Arbeit folgten: Die Synthese der Isolaktose ⁴⁾ aus Galaktose und Traubenzucker mittels der Kefirlaktase durch Emil Fischer und Armstrong ⁵⁾, die von Emmerling ⁶⁾ aus-

¹⁾ van't Hoff, loc. cit. vorige Fußnote, S. 211.

²⁾ van't Hoff, Zeitschr. f. anorg. Chem. **18** (1898) 1.

³⁾ Croft Hill, Journ. Chem. Soc. **73** (1898) 634, **83** (1903) 578. 1314; Bull. Soc. Chim. Paris **30** (1903) 1298.

⁴⁾ Daß nicht die Laktose selbst, sondern die Isolaktose durch das Ferment synthetisiert wird, rührt daher, daß der aus der Laktose gebildete Traubenzucker in einer labilen Form entsteht, die sich so rasch in die stabile Modifikation umwandelt, daß dem Ferment keine Zeit bleibt, die primäre Form zu der ursprünglichen Substanz wieder aufzubauen. Seine synthetisierende Tätigkeit macht sich nur bei dem veränderten Produkt geltend, und es resultiert dementsprechend die isomere Bisaccharose. Ganz analoge Verhältnisse liegen bei der Maltosespaltung und Synthese vor sowie offenbar auch bei der Bildung von Reversionsdextrinen (siehe z. B. S. 12).

⁵⁾ Emil Fischer, Ber. d. chem. Ges. **35** (1902) 3144; E. Frankland Armstrong, Proc. Royal Soc. London **76** (1905) 592.

⁶⁾ Emmerling, Ber. d. chem. Ges. **34** (1901) 600, 2206.

geführte Synthese des Amygdalins aus Traubenzucker und Mandelsäurenitril durch Emulsin: die Bildung des Aethylbutyrats aus Alkohol und Buttersäure mit Hilfe der Lipase von Kastle und Löwenhart¹⁾, die von Hanriot²⁾ sowie von Pottevin³⁾ bewerkstelligte Esterifizierung des Glycerins durch Mineral- und Fettsäuren durch das nämliche Agens und andere, den früher allein ins Auge gefaßten aufspaltenden Wirkungen der Fermente entgegengesetzte Synthesen.

Für den Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsel des Organismus sind diese Verhältnisse von besonderer Bedeutung. Während im Verdauungskanal nur die spaltende Tätigkeit der vorhandenen hydrolysierenden Fermente in Betracht kommt, da die Endprodukte durch die Resorption von seiten der Darmwand ununterbrochen aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden, spielen die im Blut und in den Geweben normalerweise vorhandenen analogen Fermente eine doppelte Rolle. Einerseits vermögen sie auch hier verdauend zu wirken, indem sie in die Blutbahn gelangendes körperfremdes und nach Abderhaldens bahnbrechenden Forschungen sogar blut- bzw. plasmafremdes Material angreifen, sowie ferner Reservenährstoffe des Organismus — insbesondere die Kohlenhydrat- und Fettdepots — wenn die Spaltprodukte dieser letzteren bei ungenügender Ernährung unter ein gewisses Maß herabsinken. So werden im Hunger die Fette z. B. mobilisiert. Sie gelangen ins Blut, und gegen sie richtet sich, wie Abderhalden⁴⁾ gezeigt hat, das in diesem Zustand gesteigerte Fettspaltungsvermögen des Blutes. Andererseits vermögen diese nämlichen Fermente aber auch umgekehrt im aufbauenden Sinne zu arbeiten, sobald die Konzentration der von der Darmwand resorbierten Spaltprodukte der Nahrungsstoffe ansteigt. Das Fett wird offenbar schon in der Darmwand selbst aus den Komponenten, in welche es durch die Darmlipase zerlegt worden ist, aus Glycerin und Fettsäure (Palmitin-, Stearin- oder Oelsäure) wieder zurückgebildet, und gegen dieses resynthetisierte Fett richtet sich dann wiederum die spaltende Wirkung der Blutlipase, die nach den Untersuchungen von Abderhalden⁵⁾ schon nach jeder fettreichen Mahlzeit ansteigt⁶⁾, wenn auch

¹⁾ Kastle u. Löwenhart, Amer. Chem. Journ. **24** (1900) 491, **27** (1902) 481; Amer. Journ. Physiol. **6** (1902) 331.

²⁾ Hanriot, Compt. rend. **132** (1901) 212, 842, **146** (1908) 212.

³⁾ Pottevin, Compt. rend. **136** (1903) 767, 1152, **138** (1904) 378; Bull. Soc. Chim. Paris [5] **35** (1906) 693; Ann. de l'Institut Pasteur **20** (1906) 901.

⁴⁾ Abderhalden, Abwehrfermente des tierischen Organismus, 2. Aufl., Berlin 1913, S. 74.

⁵⁾ Abderhalden, loc. cit. Note 4, S. 73 u. 74.

nicht so ausgesprochen wie nach der Zufuhr größerer Mengen artfremden Fettes in die Blutbahn¹⁾. Spaltung im Darmkanal, Resynthese in der Darmwand, Wiederspaltung im Blut und nochmalige Resynthese des nicht zur unmittelbaren Verbrennung gelangenden Materials in den Reservespeichern des Organismus sind also als einfache Folgewirkungen der normalen reversiblen Lipasetätigkeit zu betrachten.

Wie das Fett werden auch die höheren, als Reservestoffe fungierenden Kohlenhydrate, das Glykogen der Tiere und die Stärke der Pflanzen, unter dem Einfluß eines diastatischen Fermentes aufgebaut, sobald der Traubenzuckergehalt des Pfortaderblutes, bzw. der Pflanzensäfte, nach Zuckerzufuhr durch die Nahrung ansteigt. Dem entspricht die spaltende Fähigkeit der Blutdiastase oder des Pflanzensaftes gegenüber Glykogen und Stärke, und bei direkter Zufuhr einer Stärkelösung in die Blutbahn besitzt die gegen dieses Kohlenhydrat gerichtete Diastase auch die Fähigkeit, eine Anzahl einfacherer Kohlenhydrate, wie Rohrzucker und Milchzucker, nicht aber Raffinose zu hydrolysieren²⁾. Dagegen stellt sich bei subkutaner oder intravenöser Einverleibung sehr geringer Rohrzuckermengen ein ganz spezifisch nur gegen Rohrzucker gerichtetes Blutenzym³⁾ — also eine Invertase — auf dieses Kohlenhydrat ein, und zwar so rasch, daß schon 15 Minuten nach erfolgter Injektion die Gegenwart dieses (noch 14 Tage bis 3 Wochen nach erfolgter Einspritzung im Blut zirkulierenden) Abwehrfermentes durch das gesteigerte Reduktionsvermögen und den Uebergang der Rechtsdrehung in Linksdrehung an Gemischen des Blutplasmas des behandelten Tieres und Rohrzucker nachgewiesen werden kann.

Wie sich im Einklang mit den Bedürfnissen des Organismus der Aufbau von Fett und Kohlenhydrat von selbst reguliert, dank der reversiblen Tätigkeit der Fermente, so gilt dies aller Wahrscheinlichkeit nach auch für die Eiweißkörper. Während im Darm eine vollständige Aufspaltung des Nahrungseiweißes zu einfachen kristallinen Aminosäuren von bekannter Konstitution stattfindet, werden diese

⁶⁾ Beim nüchternen Tier kann die Lipase im Blut vollständig fehlen.

¹⁾ Siehe ferner Abderhalden u. Rona, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **75** (1911) 30; Abderhalden u. Lampé, *Ebenda* **78** (1912) 296.

²⁾ Weinland, *Zeitschr. f. Biol.* **47** (1907) 279; Abderhalden u. Brahm, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **64** (1910) 429; Abderhalden u. Kapfberger, *Ebenda* **69** (1910) 23.

³⁾ Bei größeren Rohrzuckermengen entsteht nach Abderhalden, *Abwehrfermente*, 2. Aufl., Berlin 1913, S. 89, ein auch andere Disaccharide (Milchzucker) spaltendes, also weniger spezifisches Enzym, und bei noch größeren Quantitäten wird ein Abwehrferment überhaupt nicht erhalten.

Spaltstücke nach ihrer Resorption jenseits der Darmwand wiederum zu Eiweißkörpern vereinigt. Man wird auch hier anzunehmen haben, daß die synthetisierenden Fermente zu jenen Enzymen in nächster Beziehung stehen, welche die parenterale Eiweißverdauung im weitesten Sinne vermitteln, zu jenen Fermenten also, die Abderhalden als Abwehrfermente gegenüber artfremdem und plasmafremdem Eiweiß¹⁾ bezeichnet und die für so manche Reaktion, deren sich die Immunitätswissenschaft bedient²⁾, verantwortlich zu machen sind, die aber auch jenen Fermenten analog sind, welche im Darm die Eiweißspaltung ausführen.

Bei dieser Eiweißsynthese mag es zunächst zu der Bildung des Haupteiweißkörpers des Serums, dem Serumalbumin, kommen, das dann erst den verschiedensten Körperzellen als Nährmaterial dient. Unter dem Einfluß jeder Zelle vollzieht sich dann derselbe Abbau, dem das Eiweiß im Darmkanal und bei der parenteralen Eiweißverdauung unterliegt, und in dem Maß, als sich die Spaltprodukte anreichern, geht die hydrolytische Wirkung der entsprechenden Zellenzyme in die resynthetisierende, das zelleigene Eiweiß bildende über. Ob die Serumalbumine verschiedener Tierarten identisch sind, ist schwer zu sagen. Die gefundenen Differenzen in der Zusammensetzung sind jedenfalls nicht so groß, daß man eine ungleiche Konstitution notwendigerweise annehmen müßte. Ausgeprägte Unterschiede für die verschiedenen Tierarten finden wir, wie gesagt, erst beim Gewebe- resp. Zelleiweiß. Hier haben wir die merkwürdige Tatsache zu verzeichnen, daß jede Tierart aus ein und demselben Nahrungseiweiß, aus ein und denselben Spaltprodukten, welche sich bei der Verdauung aus diesem letzteren bilden, nur artgleiches Eiweiß aufzubauen vermag. Der Mensch bildet ein anderes Eiweiß als das Pferd, oder der Hund oder irgend ein anderes Tier. Ja, jedes Organ, jedes Gewebe, jede Zelle sogar verarbeitet die zufließenden Nährstoffe nur in der Weise, daß ein Eiweiß resultiert, welches sich in nichts von dem bestehenden Organ resp. Zelleiweiß unterscheidet.

Man wird wohl nicht fehlgehen, wenn man die Lösung des Rätsels der artgleichen und, enger gefaßt, der zellgleichen Eiweißsynthese in der Identität der eiweißsynthetisierenden Fermente bei ein und derselben Art bzw. ein und derselben Zellart sucht. Die Fermente verschiedener Tierarten, verschiedener Gewebe und Zellen sogar zeigen dagegen bestimmte Unterschiede, und daher müssen sich

¹⁾ Naheres und Literatur hierüber im Abschnitt über die Abwehrfermente.

²⁾ Siehe den Abschnitt „Der lytische Immunkörper usw.“ S. 334 ff.

auch die Eiweißkörper, welche unter ihrem Einfluß aus demselben Grundmaterial entstehen, in charakteristischer Weise voneinander unterscheiden. Jeder Organismus besitzt eben in seinen Eiweißfermenten ein Etwas, das mit einem Baumeister von eigenem Geschmack verglichen werden kann; aber die Geschmacksdifferenzen, die sich beim Aufbau der Eiweißmoleküle in so prägnanter Weise geltend machen, verschwinden vollkommen, wenn die Baumeister an das Niederreißen ihrer Konstruktionen gehen. Das zu den kristallinen Spaltprodukten abgebaute hochkomplizierte Eiweißmolekül eines Menschen sieht, wenigstens qualitativ betrachtet, im wesentlichen nicht anders aus als der bis zu den nämlichen Grundsteinen zerstörte Eiweißkörper einer niederen Tierart. Mag die Synthese auch noch so sehr differieren, die Hydrolyse führt zu den nämlichen Produkten. Ob Synthese oder Hydrolyse gerade vorherrscht, das hängt wie bei den Fetten und Kohlenhydraten einzig von den Konzentrationsverhältnissen ab. Das Massenwirkungsgesetz reguliert den Eiweißstoffwechsel so gut wie den der Fette und Kohlenhydrate.

Auch bei anderen vitalen Reaktionen kommt dieser ebenso einfache als zweckmäßige Mechanismus der Selbstregulierung in Betracht. Wo immer im Organismus die Endprodukte eines fermentativen Prozesses unter normalen oder pathologischen Verhältnissen Gelegenheit haben, sich anzusammeln, bedingen sie in dem Maße, wie sie sich anhäufen, einen immer langsamer werdenden Verlauf der betreffenden Reaktion, die schließlich ganz gehemmt wird.

Steigt die Konzentration der Endprodukte noch weiter, so muß die Reaktion nunmehr mit immer steigender Geschwindigkeit in entgegengesetzter Richtung verlaufen und das Ferment wird dann gezwungen, seine frühere Tätigkeit wieder rückgängig zu machen. Beschleunigte es vorhin eine Spaltung, so muß es nunmehr die dieser Spaltung entgegengesetzte Synthese beschleunigen. Nur in einer Richtung arbeitende Fermente kommen einzig dort vor, wo die das Ferment dirigierende Reaktion irreversibel ist. Die Irreversibilität ihrerseits wird dadurch bedingt, daß die hemmenden Endprodukte in irgend einer Weise aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden.

Das Massenwirkungsgesetz ist also nach dem Gesagten geeignet, häufig die Rolle zu übernehmen, die man einfach dem Vorhandensein von antagonistisch wirkenden Substanzen zuschrieb. Ist doch die Hauptsache, warum immer gerade im rechten Moment die antagonistische Wirkung einsetzt, durch die bloße Annahme von Antagonisten dem Verständnis in keiner Weise näher gebracht, während das Massen-

wirkungsgesetz für diese Selbstregulierung eine durchaus natürliche Erklärung bietet. Demnach könnte man sich z. B. vorstellen, daß unter den die beschleunigende Wirkung des Fibrinfermentes antagonistisch beeinflussenden Substanzen, Peptone, Histone und Protamine, ihren gerinnungshemmenden Einfluß dem Umstand verdanken, daß sie selbst Produkte der mit einer Eiweißspaltung einhergehenden Tätigkeit des Fibrinfermentes sind, eine Auffassung, deren wissenschaftliche Stützen sich im Abschnitt über das Fibrinferment (S. 294 und 295) dargelegt finden.

Neben jenen, einfach nach dem Massenwirkungsgesetz hemmenden Substanzen kommen jedoch zweifellos auch antagonistisch wirkende Stoffe anderer Art vor, — echte negative Katalysatoren, welche die Fermente durch Bildung einer chemischen Verbindung mit ihnen oder in anderer Weise inaktivieren.

Diesen Paralysatoren gegenüber stehen aber andererseits auch Substanzen, welche auf die Fermente aktivierend zu wirken vermögen, und zwar ist diese zum Teil sehr beträchtliche Verstärkung der Fermentwirkung eine ungemein verbreitete Erscheinung.

Schon früher sind wir in der allgemeinen Einleitung bei Erwähnung der Oxydasen in gewissen Mangan-, Eisen- und auch anderen Metallverbindungen solchen sog. Kofermenten oder Zymoexzitatoren begegnet. Während sich aber bei der Laccase und den ihr nahestehenden Oxydationsfermenten das Koferment in direkter Bindung mit dem Hauptferment befindet, wird dieses letztere in sehr vielen anderen Fällen durch eine frei neben ihm vorhandene Substanz aktiviert.

Eine derartige Aktivierung erfährt z. B. die verzuckernde Wirkung des Speichels durch die Mineralstoffe, welche er enthält¹⁾, und das gleiche gilt für die an und für sich nur sehr schwach wirksame, fettspaltende Lipase, sobald sie mit Blutserum in Berührung kommt²⁾. Es ist sehr wohl möglich, daß die Wirkung des Serums auf dessen Gehalt an gewissen Neutralsalzen beruht, da Calcium- und Magnesiumsalze, sowie Spuren Fluornatrium den nämlichen aktivierenden Einfluß auf die Lipase besitzen. Ueberhaupt spielen die Salze des Serums eine große Rolle bei der Aktivierung der verschiedenartigsten Fermente. So wird unter anderem die Wirkung der Blutkatalase in ganz erheblichem Maße durch den Kochsalzgehalt des Serums gesteigert³⁾. Ferner vermögen manche Fermente durch Säuren, andere wieder durch

¹⁾ Guyenot, Compt. rend. Soc. Biol. 59 (1907) 768.

²⁾ Pottevin, Compt. rend. 136 (1903) 767.

³⁾ Siehe *Allg. Teil*, S. 531 u. 554.

Basen aktiviert zu werden, und da sowohl die Eiweißkörper, aus welchen der Organismus sich aufbaut, wie höchstwahrscheinlich die Fermente selbst zugleich Säuren und Basen sind, so stehen den Fermenten jederzeit ihre wichtigsten Aktivatoren zur Verfügung. Die Ursache der Fermentaktivierung kann man bei Säuren, Basen und Salzen in einer Beeinflussung des kolloiden Zustandes und bei den beiden erstgenannten außerdem in einer Beeinflussung des Dissoziationszustandes der Fermente erblicken.

Von großer biologischer Bedeutung ist die, wohl sehr oft mit einer durch Säuren oder Basen und durch Salze bewerkstelligten Umladung des Kolloids in Zusammenhang stehende Tatsache, daß für die Wirkung der Aktivatoren auf ein bestimmtes Ferment ein Konzentrationsoptimum vorhanden ist. Mit wachsender Menge des Aktivators nimmt daher die Wirkung des Fermentes nur bis zu einer bestimmten Grenze zu. Wird dieselbe überschritten, so vermag der Aktivator nicht mehr als solcher, d. h. also reaktionsbegünstigend einzuwirken, er hemmt vielmehr die Reaktion und arbeitet somit seiner früheren Tätigkeit entgegen. Auch hier stoßen wir also auf einen wichtigen Mechanismus der Selbstregulierung vitaler Vorgänge. Wenn sich also unter bestimmten, sei es normalen, sei es anormalen Bedingungen irgend eine aktivierende Substanz im Organismus über ein gewisses Maß hinaus vermehrt, so schlägt die Reaktionsaktivierung in eine Reaktionshemmung um, wodurch unter allen Umständen dem übermäßigen, das vitale Gleichgewicht störenden Ansteigen irgendwelcher Fermentprozesse eine Schranke gesetzt ist.

Die Toxine.

Ehe wir uns der speziellen Beschreibung der Fermente zuwenden, wollen wir noch einer Körperklasse gedenken, die man als eine Untergruppe der Fermente betrachten kann, es sind die Toxine.

Die chemischen Verhältnisse der Toxine sind denjenigen der Enzyme durchaus analog, wie dies dem engen verwandtschaftlichen Zusammenhang der beiden Körpergruppen entspricht. Es steht fest, daß die Toxine spaltende Prinzipie enthalten¹⁾.

Zwischen den Toxinen und den Bakterien, welche die Toxine produzieren, besteht die gleiche Beziehung wie zwischen den Enzymen und den Organismen, die diesen fermentativ reagierenden Stoffen ihre

¹⁾ Siehe z. B. Abderhalden, Abwehrfermente, 2. Aufl., Berlin 1913, S. 109.

verdanken. Als Toxine würde man jedoch alle jene Körper bezeichnen, die von Bakterien oder verwandten erzeugt, im Organismus tiefgreifende Veränderungen herbeiführen. Man würde unter Toxinen speziell die gegen lebendige gerichteten Enzyme parasitischer „geformter Fermente“ haben. So hat sich — um ein Beispiel herauszugreifen — das akut wirkende Toxin von Cholera vibrios, welches (er¹⁾) auf Hammelblutplatten züchtete, identisch war mit dem roten Blutkörperchen gerichteten Hämolysin dieser

prinzipielle Abgrenzung der Toxine von den Enzymen. Weise möglich. Die Schädigung, welche das Toxin herbeiführt, kommt keineswegs nur dem Toxin zu, sondern, denen in ihrer natürlichen Umgebung nicht nur keine, sondern eine außerordentlich nützliche Rolle zukommt, welche den Toxinen im Organismus mehr oder weniger tiefgreifenden Veränderungen hervorzurufen, wenn sie an einem anderen, dem naturgemäß zukommenden Ort im Körper zur spalten- gelangen.

Der Organismus wehrt sich dann gegen den deplacierten Einwirkenden wenigstens qualitativ gleich wie gegen ein gewöhnliches Gift. Bildung von spezifischen Antikörpern, denen die Aufgabe obliegt, die schädliche Wirkung des Enzyms oder Toxins zu hemmen. In einem Tier z. B. Pepsin bzw. Lab eingespritzt, so entsteht darum das betreffende Antipepsin oder Antilab.

Die charakteristische Antikörperbildung ist ein höchst eigenartiges Faktum und gehört zum Wesen der Toxine und Gifte im allgemeinen, die dadurch gegenüber den übrigen Giften eine Sonderstellung einnehmen.

Wie die Art, wie solche Gegengifte im Organismus entstehen, sich verhalten, sieht man auseinander.

Man stellt sich vor, daß die Zellen des Körpers analog den Benzolderivaten sog. Seitenketten besitzen, welche ein Gift durch die Ansiedlung eines Bakteriums in den Organismus festsetzt, verankern. Durch diese Bindung des Toxins an eine Zelle der Zelle wird die letztere vergiftet und die Seitenkette giftig gemacht.

Die Zelle schreitet nun zur Regeneration der untauglichen Atomgruppe. Nach dem Weigertschen Gesetz ist aber eine jede biologische Regeneration mit einer Ueberproduktion verknüpft. Es würde daher nicht allein die untaugliche Seitenkette ersetzt, sondern verschiedene überschüssige Seitenketten derselben Art würden neu gebildet. Mit dem Ueberschuß weiß aber die Zelle nichts anzufangen; sie stößt daher alle diese Seitenketten bis auf eine ab. Die abgestoßenen Glieder der Zelle zirkulieren nun frei im Blut, und gelangt ein Toxin in den Körper hinein, welches demjenigen gleich ist, das die Ursache der Seitenkettenbildung war, so findet derselbe Bindungsvorgang zwischen den frei zirkulierenden Seitenketten und dem Toxin statt, welcher vorher bei der gebundenen Seitenkette zur Vergiftung der Zelle geführt hatte. Das Toxin würde also durch diese Schutztruppe, welche es bei seinem erstmaligen Eindringen in den Körper selbst erzeugte, abgefangen, ehe es von den Zellen verankert werden kann. Dadurch ist der Organismus vor der Vergiftung durch dieses Toxin geschützt, solange frei zirkulierende Seitenketten in genügender Menge im Blut vorhanden sind, um den Feind zu fesseln. Die freien Seitenketten würden also nach Ehrlichs Anschauung die Antikörper repräsentieren.

Ohne Zweifel ist diese Ehrlichsche Seitenkettentheorie von einer faszinierenden Genialität. Sie steht jedoch mit manchen Tatsachen in Widerspruch. Ganz abgesehen von dem Urwald von verschiedenen Seitenketten, den die Zellen aufweisen müßten, wenn sie für jedes Toxin ein spezifisches Antitoxin schaffen sollten, sind die Eigenschaften der sog. Verbindung zwischen Toxin und Antitoxin derart, daß sie allen Gesetzen, die für feste chemische Verbindungen gelten, widersprechen. Das Charakteristikum einer festen chemischen Verbindung ist, daß in ihr die Komponenten ihre Selbständigkeit und ihre individuelle Eigentümlichkeit vollständig verloren haben.

Für die Toxin-Antitoxinverbindungen dagegen besteht eine derartige Beschränkung nicht, denn ihre Bestandteile lassen sich sogar durch Diffusion (in manchen Fällen) voneinander trennen, und Temperaturerhöhung und eiweißspaltende Enzyme zerstören in der Verbindung häufig die eine Komponente, meist das Antitoxin, während die andere Komponente unversehrt bleibt.

Auch Arrhenius' vermittelnde Vorstellung, daß es sich um halbdissoziierte Verbindungen handelt, führt zu unlösbaren Schwierigkeiten, weil lockere Verbindungen zwischen den freien Seitenketten und den Toxinen auch lockere Verbindungen zwischen den an die

Zellen gebundenen Seitenketten und den Toxinen zur Voraussetzung haben, da es sich in beiden Fällen um den nämlichen Vorgang handelt. Damit wird aber die ganze Giftwirkung der Toxine illusorisch.

Eine andere Auffassung der Toxinwirkung und der Antitoxinbildung im Organismus als die angegebene wird dagegen durch die Analogie der Toxine und Enzyme in Verbindung mit der Tatsache der Reversibilität der Fermentwirkungen nahegelegt, und nur im Sinne dieser Auffassung — welche ich schon in meiner Antrittsvorlesung¹⁾ vertreten habe und welche einige Jahre später auch von anderer Seite akzeptiert worden ist²⁾ — rechtfertigt sich die Erörterung der Toxinwirkung an dieser Stelle.

Auch die Wirkung der Toxine läßt sich als eine Art Verdauungsprozeß deuten, der sich gegen lebenswichtiges Gewebematerial richtet und daher den Organismus schädigt. Die Toxine wären die verdauenden Enzyme der pathogenen Bakterien, die Werkzeuge, deren sich diese letzteren bedienen, um die Moleküle des lebendigen Substrats zur Resorption vorzubereiten, d. h. in einfachere Spaltprodukte überzuführen, die von den Bakterien aufgenommen werden können. Gerade diese Spaltprodukte der eigenen Körpersubstanz wären es nun aber, welche unter bestimmten Bedingungen hervorragende Waffen des Organismus werden könnten; muß doch das Toxin, gerade so wie jedes andere Ferment, in seiner Tätigkeit dem Massenwirkungsgesetz nachhinken. Liegen die Konzentrationsverhältnisse so, daß sich ohne die Gegenwart eines Toxins eine allmähliche Spaltung abspielen müßte, so beschleunigt das Toxin diese Spaltungsreaktion. Aber im selben Moment, wo sich die Konzentrationsverhältnisse mit der Anhäufung der Spaltprodukte an den Enden der Reaktionsbahn so verändert haben, daß das Massenwirkungsgesetz die Resynthese der ursprünglichen Verbindung aus den Spaltprodukten verlangt, kehrt auch das Toxin seine Funktion um, — indem es synthetisiert, wo es vorher spaltete, macht es somit sein eigenes Zerstörungswerk zunichte.

Die Voraussetzung für die Reversibilität der Toxinwirkung ist,

¹⁾ Woker, Probleme der katalytischen Forschung, Leipzig 1907.

²⁾ So hat Ruszyák, Zeitschr. f. Immunitätsforschung u. experim. Therap., I. Teil, 10 (1911) 135, darauf hingewiesen, daß durch die Annahme, daß Antitoxine die spezifischen Spaltprodukte sind, die Beobachtungen an „Toxin-Antitoxinverbindungen“ einer einheitlichen Deutung zugänglich werden. Auch dieser Forscher hat hervorgehoben, daß die Experimente keine Beweise gegen die Enzymnatur der Toxine erbracht haben.

wie sich dies aus dem Gesagten als selbstverständliche Folgerung ergibt, die Möglichkeit für ein Ansammeln der Spaltprodukte.

Gegen eine solche Anhäufung richtet sich nun aber das toxin-erzeugende Bakterium. Es braucht nicht nur die durch das Toxin zubereiteten Spaltprodukte des Substrates zu seiner Ernährung, sondern es muß auch danach trachten, diese unliebsamen Schutztruppen des Organismus, die das Bakterientoxin in ihre eigenen Dienste zwingen, so rasch als möglich zu entfernen.

Wo also lebenskräftige Bakterien ihrem Toxin gleichsam auf dem Fuße folgend den Organismus überschwemmen, kämpft derselbe einen wenig aussichtsreichen Kampf, denn die Antikörper, die sich auf Kosten des Organismus unter dem Einfluß des Toxins bilden, dienen nur den Absichten der freßlustigen Bakterien. Die Entfernung der Spaltprodukte erfolgt so rasch, daß es nicht zu einer Umkehrung der Toxinwirkung kommen kann. Derartigen Bakterien gegenüber würde das antitoxische Prinzip vollständig versagen. Auch bei künstlicher Zufuhr von Antikörpern durch Einspritzung eines antitoxischen Immunserums ist wenig gegen die Bakterien auszurichten.

Das Scheitern so vieler Versuche gegen Streptokokken und andere Bakterien, welche die Tendenz haben, sich möglichst im Körper auszubreiten, ein wirksames antitoxisches Serum zu erhalten, steht mit unseren theoretischen Konklusionen im Einklang. Dem gegenüber existieren aber andere Bakterien, welche sich nur am Ort ihres Eindringens in den Körper ansiedeln.

Trotz dieser Lokalisation sind sie aber nicht minder gefährlich als die eben genannten. Denn von der Stelle ihrer Ansiedlung aus wird ihr Gift vom Kreislauf des Organismus aufgenommen. Bei diesen eigentlichen Toxinbakterien, zu denen vornehmlich Diphtherie- und Tetanusbazillus gehören, gelangt also die Hauptmenge des Toxins an Partien des Organismus zur Wirkung, die frei von den lebenden Erregern sind, und es liegen daher hier die Bedingungen für eine Umkehrbarkeit der Toxinwirkung außerordentlich günstig. Man hat nur dafür Sorge zu tragen, daß im Organismus eine möglichst reichliche Anhäufung der Spaltprodukte des betreffenden Bakterientoxins zustande kommt, was durch die sog. passive Immunisierung gelingt, d. h. also dadurch, daß man einem anderen Tier das Toxin in allmählich steigenden Dosen einspritzt, wodurch es zur Antikörperbildung veranlaßt wird, ihm hierauf das antikörperhaltige Blut entzieht und das daraus gewonnene Serum dem zu schützenden Menschen einspritzt.

Wie das in den Körper eindringende Bakterium das Bestreben hat, das lebende Substrat soweit als irgend möglich durch seine Toxine abzutöten und zu verdauen, so hat umgekehrt, wie schon erwähnt, auch der Organismus die Tendenz, das eingedrungene Bakterium durch einen verdauungsartigen Vorgang zu eliminieren.

Schon die hydrolysierenden Enzyme, die sich normalerweise im Körper finden und jeder Zelle eigentümlich sind, richten sich naturgemäß auch gegen das fragliche Bakterium und unter geeigneten Umständen können schon solche unspezifische, in jedem Organismus vorhandene, bakterizide Substanzen hinreichen, um dasselbe zu zerstören. Allmählich bildet sich dann auch ein spezifischer, nur gegen den eingedrungenen Erreger gerichteter, lytischer Immunkörper, d. h. ein bakterienlösender und damit zugleich bakterientötender Stoff, eines jener gegen geformtes oder ungeformtes Material gerichteten Abwehrfermente (Abderhalden, H. Pfeiffer), von denen soeben als Träger der parenteralen Eiweißverdauung die Rede war. Der Organismus besitzt also Summa summarum zwei Möglichkeiten, um die Bakterien unschädlich zu machen. Er kann durch die unter dem Einfluß des Toxins aus seiner Leibessubstanz gebildeten Spaltprodukte das zerstörende Toxin zur Umkehrung seiner schädlichen Tätigkeit zwingen und er kann ferner die Bakterien durch einen Verdauungsprozeß eliminieren, über den eingehender in dem nun folgenden Kapitel „Hydrolysierende Fermente“ berichtet ist.

I. Hydrolysierende Fermente.

Nicht allein der Verdauungskanal der höheren Tiere birgt Fermente dieser Art, wie das Ptyalin des Speichels, das Pepsin des Magensaftes, das Trypsin der Pankreasdrüse, sondern beinahe jedes noch so niedrig organisierte Lebewesen ist im Besitze von diesem oder jenem hydrolysierenden Ferment, dem die Bedeutung eines Schlüssels zu der Vorratskammer des betreffenden Lebewesens zukommt.

Ohne diesen Schlüssel müßte jeder Organismus angesichts der reichlichsten Nahrung verhungern, da er nicht imstande ist, das Nährmaterial als solches aufzunehmen, gleichviel, ob dasselbe Eiweiß, Fett oder Kohlenhydrat ist.

Erst durch Ueberführung des zu assimilierenden Stoffes in einfacher konstituierte, diosmierbare Spaltprodukte wird derselbe für den Organismus resorbierbar und zugleich des artfremden Charakters beraubt. Dieser unbedingt erforderliche Aufschluß des Nährmaterials

erfolgt also durch spezifische, auf den zu spaltenden Stoff eingestellte, die Aufspaltung begünstigende Fermente.

Der biologischen Wichtigkeit entspricht auch die analytische. Gerade die hydrolysierenden Fermente illustrieren, daß eine nicht geringere analytische Bedeutung als den in der *ersten Abteilung des Speziellen Teils* der Katalyse besprochenen Katalysatoren, den biologischen Katalysatoren oder Fermenten zukommt, d. h. also nach dem Vorausgeschickten jenen fast nur in ihren Wirkungen bekannten Stoffen, deren sich die Zelle, die sie produziert, bedient, um sich mit der Außenwelt in Relation zu setzen und um die Materien aufzuschließen, die sie zu ihrem Lebensunterhalt bedarf.

Im folgenden sind die den verschiedenen hydrolysierbaren Substraten zugehörigen Fermente besprochen, soweit dieselben analytisch eine Rolle spielen, sei es, daß es sich um die Ermittlung der Fermente selber handelt, oder um die Reaktionen, welche sie beschleunigen.

Entsprechend den hauptsächlichlichen Reservedepots der Natur unterscheiden wir folgende Klassen von hydrolysierenden Fermenten:

1. Die kohlenhydratspaltenden Fermente (Karbhydrasen) oder saccharifizierenden Fermente mit den Untergruppen:

a) Disaccharasen: Invertase, Maltase, Laktase, Trehalase, Melibiase, Turanase, Gentiobiase, Cellobiase.

b) Trisaccharasen: Raffinase (Lävulopolyase), Melezitase, Gentianase, Rhaminorhamnase

c) Tetrasaccharasen: Stachyase.

d) Höhere Polysaccharasen: Diastase (Amylase), Zytase (Zellulase), Seminase (Carubinase), Hemizellulase, Xylanase, Hadromase, Inulinase, Laktinase, Gelase.

e) Glykosidasen: Prunase des Emulsins und verwandte β -Glykosidasen, Myrosinase und verwandte Fermente.

2. Die eiweißspaltenden Fermente (Proteasen) mit den Untergruppen:

a) Pepsinasen, Tryptasen und Peptasen.

b) Chymasen.

c) Gerinnungsfermente.

d) Immunkörper und Abwehrfermente.

e) Amidasen (Hystozym, Urease, Arginase, Kreatase und Kreatinase, Guanase, Adenase und andere Purinamidasen).

3. Die Nukleasen (Nukleinase, Nukleotidase, Nukleosidase).

4. Die fettspaltenden Fermente (Lipasen, Esterasen).

1. Saccharifizierende Fermente.

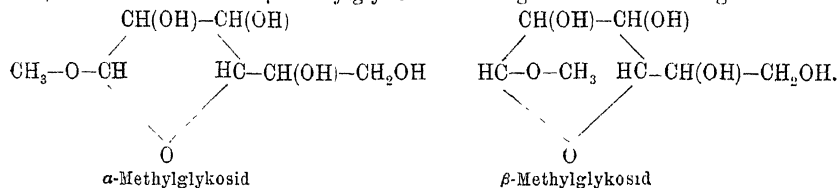
Die saccharifizierenden Fermente oder „Karbohydrasen“ — wie Oppenheimer¹⁾ in konsequenter Durchführung des bei den Fermenten sich immer mehr einbürgernden modernen Nomenklaturprinzips²⁾ diese Gruppe nennt — besitzen die für die Ernährung zahlreicher Tiere und Pflanzen unentbehrliche Fähigkeit, die Bindungen, durch welche die wichtigsten Hexosen untereinander oder mit anderen Stoffen zu einfacher oder komplizierter gebauten Polysacchariden und Glykosiden verknüpft sind, zu lösen. Eine Aetherase genereller Natur, die gleich den Wasserstoffionen an und für sich gleichartige Aetherbindungen aufzuspalten vermag, gibt es freilich nicht. Vielmehr hat sich eine tiefgreifende Spezifität ausgebildet, die den feinen strukturellen Verschiedenheiten innerhalb der Kohlenhydratgruppe entspricht. Schon im *Allgemeinen Teil* trat im Kapitel „Konstitutive Faktoren in der Katalyse“ die Bedeutung des stereochemischen Moments bei der Lösung derartiger Aetherbindungen auf fermentativem Wege klar zutage in dem dort erwähnten Verhalten des rechtsdrehenden α - und des linksdrehenden β -Methylglykosids³⁾ gegenüber verschiedenen Enzymen und völlig analoge Verhältnisse wie bei diesen einfachsten von Emil Fischer⁴⁾ synthetisierten Repräsentanten finden sich in der ganzen großen Körperklasse, welche die ätherartigen Verbindungen der Zucker unter sich und mit anderen Körpern umfaßt.

Die Kenntnis dieser Tatsache gibt dem Analytiker sowohl die Möglichkeit, die Zuckerarten⁵⁾ wie die darauf eingestellten Fermente

¹⁾ Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, 4. Aufl., Bd. I, Leipzig 1913, S. 190 ff.

²⁾ An den lateinischen Stamm des der Spaltung unterliegenden Substrats wird die Endung „ase“ angehängt, z. B. Maltase für das Maltose-, Laktase für das Laktose-, Amylase für das Amylum (Stärke) spaltende Ferment.

³⁾ Armstrong u. Glover, Proc. Royal Soc. London, Ser. B 80 (1908) 312, haben dem α - und β -Methylglykosid die folgenden Formeln zugeschrieben:



⁴⁾ Emil Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 26 (1898) 61.

⁵⁾ Den Zuckerarten reihen sich an im Verhalten gegenüber den betreffenden Fermenten gewisse Verbindungen der Zucker, wie die Osazone und Osone [siehe

in zwei große Klassen vom α -Typus und vom β -Typus zu scheiden. Vermag ein unbekanntes Ferment nur eines oder mehrere Glykoside, die wie die sämtlichen natürlichen Glykoside dem durch Linksdrehung charakterisierten β -Typus angehören, zu hydrolysieren, während es sich den α -Glykosiden gegenüber indifferent verhält, so hat es sich damit als β -Ferment gekennzeichnet, während im entgegengesetzten Fall das zu prüfende Ferment dem α -Typus zugehört. Umgekehrt läßt sich durch die Feststellung, ob die Spaltung eines unbekannten Glykosids durch ein α -Ferment oder durch ein β -Ferment bewerkstelligt wird, entscheiden, ob jenes Substrat den Charakter eines α -Glykosids oder eines β -Glykosids trägt. Aus einem negativen Befund allein kann jedoch nicht auf die Abwesenheit des entsprechenden Ferments bzw. Substrats geschlossen werden. Ist die Hydrolyse innerhalb der α -Klasse z. B. nachgewiesen, so dient ein negativer Befund der β -Klasse gegenüber nur dazu, festzustellen, daß ein — von den Trisacchariden an — bei den Polysacchariden nicht selten realisierter Fall nicht vorliegt: der Fall, daß das Molekül von beiden Fermentgruppen, wenngleich in völlig verschiedenartiger Weise, angegriffen wird. Gentianose, Stachyose und Raffinose, welch letztere durch die Prunase des Mandelemulsins (β -Ferment) zu Rohrzucker und Galaktose, durch Hefeenzym (α -Ferment) zu Melibiose und Fruktose hydrolysiert wird, sind Beispiele für den Doppelcharakter derartiger Substrate, die ungemein verwickelte Verhältnisse¹⁾ darbieten können²⁾. Wie ein positiver Befund in der α -Reihe z. B. nach dem soeben Ausgeführten nicht ohne weiteres einen negativen Befund innerhalb der β -Reihe voraussetzen läßt, so darf erst recht nicht umgekehrt aus einem negativen Befund in der α -Reihe auf einen positiven in der β -Reihe geschlossen werden. Sehr viele Glykoside, nämlich außer den d-Mannosiden alle diejenigen, die in ihrem Molekül die bekanntlich unvergärbaren Zucker mit fünf und sieben Kohlenstoffatomen und die Hexosen, die den in der Natur vorkommenden isomer sind, enthalten, werden von Fermenten überhaupt

E. Fischer u. Geza Zemplen, Ann. d. Chem. 365 (1909) 1, 372 (1909) 254; Neuberg u. Saneyoshi, Biochem. Zeitschr. 36 (1911) 44; Bierry, Thèse Paris 1911; Biochem. Zeitschr. 44 (1912) 415, 426].

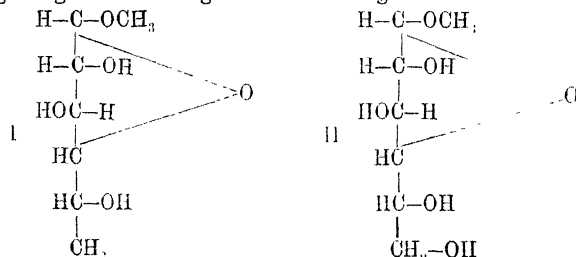
¹⁾ Siehe Oppenheimer, loc. cit., Fußnote 1 vorige Seite, S. 197.

²⁾ Die Angriffsfähigkeit braucht für die beiden Fermenttypen demselben Substrat gegenüber nicht gleich zu sein. Sie kann für ein α -Ferment bisweilen erst dann zutage treten, wenn das Substrat schon durch ein β -Ferment verändert worden ist oder umgekehrt. So wird die Amygdalose zunächst durch die Amygdalase vom α -Typus partiell hydrolysiert, und dann erst setzt die weitere Spaltung durch ein β -Ferment ein (siehe Oppenheimer, loc. cit. S. 198).

nicht angegriffen. Unter den Kautelen, die bei negativen Resultaten geboten sind, kann daher der Analytiker aus der völligen Resistenz den bekannten α - und β -Fermenten gegenüber auf das Vorhandensein von Glykosiden, die einen der erwähnten Zucker enthalten, schließen. Tritt dagegen eine Spaltung durch α - oder β -Fermente ein, so muß das zu prüfende Glykosidmolekül entweder d-Glukose¹⁾, d-Fruktose oder d-Galaktose enthalten. Der Nachweis solcher Zucker im Reaktionsgemisch vermag dann weiter zu entscheiden, ob ein dem α - oder β -Typus zugehörendes Ferment in die Untergruppe der Glukosidasen, der Fruktosidasen oder der Galaktosidasen zu verweisen ist, je nachdem es eben das Vermögen zur Glukosid-, Fruktosid- oder Galaktosidspaltung besitzt²⁾.

Nicht immer kann die Zugehörigkeit eines Ferments zu dieser oder jener Kategorie mit Sicherheit bestimmt werden, doch gehören aller Wahrscheinlichkeit nach zu den α -Glukosidasen, die Maltase, die Trehalase und die Amygdalase; zu den β -Glukosidasen die Cellobiase, die Gentiobiase, die Prunase des Mandelemulsins; zu den α -Fruktosidasen die Invertase und Lävulopolyase und zu den β -Galaktosidasen verschiedene Laktasen und die Melibiase, über welche Fermente im folgenden einzeln berichtet ist.

¹⁾ Da das von Emil Fischer u. Zach, Ber. d. chem. Ges. 45 (1912) 3761, synthetisierte β -Methyl-d-isorhamnosid (I) als ein β Methyl-d-Glukosid (II), bei dem nur das Hydroxyl der endständigen — für die optische Aktivität belanglosen — CH_2 -OH-Gruppe durch H ersetzt ist, betrachtet werden kann, so macht sich in diesem einzigen bis jetzt bekannten fermentativ spaltbaren Pentosederivat die spaltungsbegünstigende Wirkung der d-Glukose geltend.



²⁾ Um eine Verwirrung in der Nomenklatur möglichst zu vermeiden, sei betont, daß unter die allgemeine Bezeichnung Glykoside sämtliche ätherartige Verbindungen der Kohlenhydrate unter sich oder mit anderen Körpern fallen, während wir die Bezeichnung Glukoside speziell für die aus Glukose gebildeten Glykoside in Vorschlag bringen möchten, wie die Namen Fruktoside und Galaktoside die entsprechenden aus Fruktose oder Galaktose hervorgegangenen und in diese wieder spaltbaren Glykoside bezeichnen.

a) Disaccharasen.

Bevor wir uns der speziellen Beschreibung der Fermente dieser Gruppe und der Würdigung ihrer analytischen Bedeutung zuwenden, sei eine knappe Wegleitung gegeben, wie der Analytiker das ungleichartige Verhalten der verschiedenen hierhergehörigen Fermente gegenüber einer Reihe von entsprechenden Substraten in der Praxis heranzuziehen vermag, um sich über die Natur des Substrates oder über die Natur des einwirkenden Fermentes zu orientieren.

1. Identifizierung der Disaccharate.

Es liege eine zuckerhaltige Lösung vor, aus der ein die Natur des betreffenden Zuckers klar stellendes Osazon aus irgend einem Grunde nicht erhalten werden konnte.

Auf Teile dieser Lösung läßt man eine Reihe von „geformten“ und „ungeformten“ Fermenten einwirken, wobei sich an Hand einer Veränderung des Drehungsvermögens mittels des Polarisationsapparates sowie chemisch an Hand einer Aenderung des Reduktionsvermögens bei der Einwirkung einiger Fermente Spaltung nachweisen läßt.

Die nächste Aufgabe ist dann die Feststellung der Spaltprodukte die eine wesentliche Einschränkung der Zahl der in Betracht fallenden Substrate ermöglicht, unter denen dann weiter eine Variierung der gebräuchlichsten Fermente die engere Wahl zu treffen gestattet. Für die Identifizierung der Spaltprodukte kommt der Osazondarstellung naturgemäß die wichtigste Rolle zu, und da die Glukose am häufigsten als Spaltprodukt auftritt, und da gerade für die Darstellung ihres Osazones die Methoden am besten ausgearbeitet sind¹⁾, so wird es

¹⁾ Nach der Modifikation der Methode von Emil Fischer, die Jaksch empfohlen und Sahli, Klin. Untersuchungsmethoden, Bd. 2, 1. Hälfte, 6. Aufl., Leipzig u. Wien 1914, S. 59. speziell für den Zuckernachweis im Harn übernommen hat, werden 10 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit mit zwei Tropfen einer konzentrierten Bleizuckerlösung versetzt und nach der Filtration ein Tropfen Essigsäure hinzugefügt. Hierauf setzt man dem Filtrat eine „erbsengroße Menge“ von salzsaurem Phenylhydrazin und eine „bohnen große Menge“ von essigsaurem Natron hinzu, stellt das Gemisch während einer halben Stunde in ein kochendes Wasserbad und läßt es dann im Wasserbad erkalten. Wohl infolge der etwas vagen und sonderbar anmutenden Angabe über die Mengenverhältnisse fallen die Resultate im allgemeinen weit besser aus, wenn die Fischersche Methode mit einem Gemisch von zwei Teilen Phenylhydrazinchlorhydrat und drei Teilen Natriumazetat ausgeführt wird, und wenn der Phenylhydrazingehalt des Reaktionsgemisches ungefähr der dreifache des Zuckergehaltes ist. Statt dieser

häufig gelingen, ein Osazon aus fermentativ hydrolysierten Zuckerslösungen zu isolieren, wo dies bei der unveränderten Lösung nicht möglich war. Immerhin kann diese glänzende Methode, durch welche Emil Fischer Licht in das Gewirr der Zuckerverbindungen gebracht hat, bisweilen wohl infolge einer die Kristallisation störenden Beimengung selbst bei Glukose versagen. In solchen Fällen kann die von Beyerinck¹⁾ in die biochemische Analyse eingeführte auxanographische Methode wertvolle Dienste leisten.

Sie beruht auf der spezifischen Einstellung bestimmter Fermente und damit der Lebewesen, welche diese absondern gegenüber gewissen Substraten und der absoluten Indifferenz gegenüber anderen. Impft man daher eine Lösung mit einem Pilz, der z. B. nur auf Traubenzucker zu wachsen vermag, wie der *Saccharomyces apiculatus*, so beweist das Angehen der Kultur die Gegenwart ihres spezifischen Nährbodens, eben der Glukose. Ein negativer Befund dürfte dagegen, namentlich wenn die Methode für die Glykosiduntersuchung im engeren Sinn herangezogen werden soll (bei der neben indifferenten Zuckern aromatische Komponenten mit Hydroxylgruppen im Benzolkern, welche die Vitalität des Pilzes erheblich beeinträchtigen, vorhanden sind), nur mit größter Vorsicht zu bewerten sein. Besonders prägnant stellt sich die auxanographische Methode in solchen Fällen dar, wo die normale Lebenstätigkeit des spezifisch auf das betreffende Substrat eingestellten Mikroorganismus von Leuchterscheinungen begleitet ist. So hat Beyerinck²⁾ die Existenz der Laktase dadurch nachweisen können, daß er Milchwasserhefe auf Laktosenährböden einwirken ließ, die er mit Leuchtbakterien impfte. Da die Leuchtbakterien auf Milchwasser allein nicht gedeihen können, wohl aber auf glukosehaltigen Nährböden, so trat das die normale Entwicklung dieser Lebewesen ver-

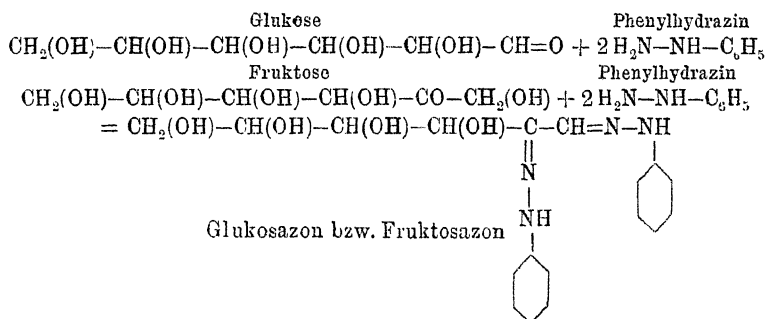
Methode kann auch diejenige von Cipollina [Deutsche med. Wochenschr. 1901 S. 334 (siehe daselbst auch andere Ausführungsarten der Osazonprobe, die von Neumann und Kowarski angegeben worden sind)] in Anwendung kommen. Danach wird ein Reagenzglas mit fünf Tropfen der reinen Phenylhydrazinbase, $\frac{1}{2}$ ccm Eisessig und 4 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit beschickt, worauf man das Gemisch unter beständigem Schütteln eine Minute lang über einer kleinen Flamme kocht. Dann setzt man vier bis fünf Tropfen Natronlauge (spez. Gew. 1,16) hinzu, wobei die Flüssigkeit ihren sauren Charakter nicht verlieren darf, kocht nochmals auf und läßt dann erkalten, worauf sich meist rasch die für das Osazon typischen rosettenartigen Kristallaggregate und Nadelgarben bilden. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 204°.

¹⁾ Beyerinck, Zentralbl. f. Bakt. 6 (1889) 44, [2] 1 (1895) 221.

²⁾ Derselbe, loc. cit. ältere Literaturangabe von voriger Fußnote.

ratende Leuchten als Reagens auf die bei der Milchzuckerspaltung entstehende Glukose auf.

Ist nun nach einer der hier angeführten Methoden die Anwesenheit von Glukose im Spaltungsgemisch eines Disaccharids festgestellt, so entsteht die weitere Frage, ob sie das einzige Spaltprodukt sei oder neben anderen Zuckern auftrete, als welche bei Disacchariden Fruktose und Galaktose in Betracht kommen. Das Ergebnis der Osazonprobe kann nur über die Beimischung der letztgenannten Hexose entscheiden, nicht aber über die Gegenwart von Fruktose, deren Osazon bekanntlich mit dem Glukosazon identisch ist.



Es bestehen allerdings für die Fruktose charakteristische Reaktionen, die bei Einhaltung bestimmter Bedingungen eine Verwechslung mit Glukose vermeiden lassen¹⁾.

Hat sich nun Glukose als alleiniges Spaltprodukt herausgestellt, so schränkt sich der Kreis der in Betracht fallenden Disaccharide auf die folgenden sechs Repräsentanten ein: Amygdalose, Cellobiose, Gentiobiose, Isomaltose, Maltose und Trehalose. Zur weiteren Entscheidung, welches dieser Disaccharide in der ursprünglichen Lösung vorhanden sei, dient dann die Prüfung mit einer Anzahl enzymhaltiger oder enzymabsondernder Materien. Unter den fermenthaltigen Materien tierischer Abkunft sind zu nennen: Darmsaft, Blut, Säfte von Wirbellosen. Als pflanzliche enzymführende Materien und Organismen kommen in Betracht: Mandelemulsin, Schimmelpilze, obergärige und untergärige Hefe²⁾. Vermag keines der angegebenen Fermente eine Spaltung zu bewerkstelligen, so kann in der Lösung nur die auf synthetischem Wege hergestellte Isomaltose vorliegen; spalten dagegen die angegebenen fermentführenden Materien alle mit Ausnahme des

¹⁾ Siehe darüber in der 1. Abteilung des *Spez. Teils* im Kapitel Katalyse durch Wasserstoffionen, S. 143 u. 144.

²⁾ Milchzuckerhefen spalten keines der nur Glukose liefernden Disaccharide.

Mandelemulsins bzw. dessen wirksames β -Ferment, die Prunase, so handelt es sich um Maltose. War den drei vorhin genannten Zuckern die Indifferenz gegenüber Mandelemulsin gemeinsam, so ist umgekehrt den drei übrigen Biosen die Spaltbarkeit gegenüber diesem Ferment eigentümlich, während sich im Gegensatz dazu die auf Maltose und Trehalose wirksame obergärige Hefe hier inaktiv verhält¹⁾. Diese Gegensätzlichkeit läßt den folgenden Gang der Untersuchung als empfehlenswert erscheinen:

a) Einwirkung von obergäriger Hefe: Ein positives Resultat beweist die Gegenwart von Maltose oder Trehalose.

b) Einwirkung von Mandelemulsin bzw. Prunase: Ein positives Resultat beweist die Gegenwart eines der drei Zucker: Cellobiose, Gentiobiose, Amygdalose. Ein negatives Resultat bei a) und b) zeigt die Anwesenheit von Isomaltose an.

c) Einwirkung von untergäriger Hefe: Sie dient dazu, die engere Wahl zwischen den unter a) und b) genannten Zuckern zu treffen.

ad a): Wird der fragliche Zucker durch untergärige Hefe vergoren, so liegt Maltose, im entgegengesetzten Fall Trehalose vor.

ad b): Wird der fragliche Zucker durch untergärige Hefe vergoren, so handelt es sich um Amygdalose, im entgegengesetzten Fall um Gentiobiose oder Cellobiose.

d) Einwirkung von Darmsaft, Wirbellosen bzw. deren verdauenden Säften und Schimmelpilzen: Diese Spaltungen könnten vielleicht herangezogen werden, um eine Entscheidung zu treffen, ob Gentiobiose oder Cellobiose vorliegt. Doch würde dies nur dann der Fall sein, wenn die für die drei Fermentmaterien sich findenden Angaben²⁾, welche alle positiv lauten, bei den noch nicht geprüften Fermenten hier oder dort im negativen Sinn ergänzt würden, wenn also z. B. die noch nicht untersuchte Gentiobiose durch Darmsaft im Gegensatz zur Cellobiose nicht angegriffen würde³⁾; oder

¹⁾ Gemäß der feinen stereochemischen Spezifität der Fermente, welche deren Scheidung in α - und β -Glukosidasen notwendig macht, stehn sich also wohl auch hier einerseits die α -Glukosidase, Maltase und Trehalase der wirksamen Hefe und die β Glukosidase (Prunase) des wirksamen Mandelemulsins, anderseits die entsprechenden Zucker des α -Typus (Maltose und Trehalose) und des β -Typus (Cellobiose und Gentiobiose) gegenüber. Die Amygdalose nimmt neben den reinen Kohlenhydraten als Glykosid im engeren Sinn eine Sonderstellung ein, die daher an der betreffenden Stelle nähere Erörterung erfahren wird.

²⁾ Lintner, Wochenschr. f. Brauerei (1900) Heft 48 ff.

³⁾ Amygdalose, welche durch Darmsaft ebenfalls angegriffen werden soll.

wenn der Spaltbarkeit der Gentiobiose durch Schimmelpilze eine Nichtspaltbarkeit der Cellobiose gegenüberstände.

2. Identifizierung der Disaccharasen.

Der umgekehrte Weg, vom bekannten Substrat ausgehend auf das unbekannte Ferment zurückzuschließen, kann auf Grund der vorigen Ausführungen ebenfalls beschritten werden, wenngleich die Natur einer zur Prüfung gelangenden fermentativen Materie tierischer oder pflanzlicher Herkunft in dem vorliegenden Fall oft rascher durch andere Methoden erkannt werden kann, wenn nicht überhaupt bei „geformten Fermenten“ der bloße Augenschein genügt. Die Tatsache, daß Schimmelpilze und Wirbellose alle die erwähnten Zucker, mit Ausnahme der synthetischen Isomaltose, spalten, wird daher für den Analytiker von geringerem Interesse sein als das analoge Verhalten des Darmsaftes und das Gegenstück dazu: das völlige Fehlen einer Spaltungsfähigkeit dieser Zucker durch Milchzuckerhefen, aus welcher Eigenschaft gegebenenfalls auf die Anwesenheit solcher Zucker zurückgeschlossen werden kann. Auch die Gegensätzlichkeit im Verhalten von Maltose und Trehalose einerseits und Gentiobiose, Cellobiose und Amygdalose anderseits gegenüber obergäriger Hefe und Mandelemulsin kann eine Identifizierung dieser Materien, wo sie sich nicht von selbst ergibt, gestatten und namentlich der Auffindung der auf die erwähnten Zucker spezifisch eingestellten einzelnen Fermente, welche jene Materien führen, dienen. Das verschiedene Verhalten von obergäriger Hefe und untergäriger Hefe gegenüber Trehalose und Amygdalose kann ebenfalls zur Unterscheidung dieser beiden Hefen herangezogen werden.

Einfacher als bei den Disacchariden, die nur Glukose als Spaltprodukt geben, gestaltet sich die Analyse von Substrat und Ferment bei dem Disaccharid, das in zwei Moleküle Galaktose zerfällt: der Galaktosid-Galaktose und den aus Glukose und Galaktose, sowie Glukose und Fruktose zusammengesetzten gemischten Biosen. Der Nachweis von Galaktose allein im Spaltungsgemisch, der in erster Linie durch die Darstellung eines einheitlichen Osazons — des Galaktosazons, an Stelle eines Gemisches mit Glukosazon — geführt werden kann, ist gleichbedeutend mit der Identifizierung der Galaktosid-Galaktose, und ebenso ist der Nachweis von Fruktose (nach einer der in der 1. Abteilung des *Speziellen Teils* besprochenen Methoden)

war schon durch ihre Spaltbarkeit mittels untergäriger Hefe (siehe ad b) ausgeschaltet.

als Spaltprodukt einer Biose beweisend dafür, daß diese Biose der Rohrzucker ist, da kein anderes Disaccharid Fruktose zu geben vermag. Den drei in je ein Molekül Glukose und Galaktose zerfallenden Zuckern, der Laktose, der synthetischen Isolaktose und der Melibiose¹⁾ ist ihre Indifferenz gegenüber obergäriger Hefe gemeinsam, während die untergärige Hefe (gerade umgekehrt wie die Prunase des Mandelemulsins) nur den Milchzucker unbeeinflusst läßt und die beiden anderen Biosen spaltet. Die Melibiose und Isolaktose vermögen dann weiter durch die Tatsachen auseinander gehalten zu werden, daß einerseits die Milchzuckerhefen nur die Isolaktose hydrolysieren, die Melibiose dagegen nicht, und daß anderseits die Isolaktose gerade umgekehrt für Mandelemulsin nicht angreifbar, die Melibiose aber angreifbar ist.

Handelt es sich nur um eine Unterscheidung der beiden durch Milchzuckerhefen spaltbaren Isomeren, der Laktose und der Isolaktose, so kann hierzu sowohl Unterhefe wie Mandelemulsin (Prunase) benutzt werden. Die Unterhefe spaltet nur die Isolaktose, die Laktose nicht, während die Prunase des Mandelemulsins umgekehrt nur den Milchzucker hydrolysiert²⁾, nicht aber die Isolaktose.

Die Schlußfolgerungen, die sich auch hier für die Fermentanalyse ziehen lassen, bedürfen keiner Erläuterung mehr, umso weniger, als sich bei der nun folgenden Einzelbesprechung der Fermente dieser Gruppe noch hier und dort Gelegenheit finden wird, auf diese Verhältnisse zurückzugreifen. Es seien zunächst erörtert die α -Fermente der Disaccharasen.

Invertase. Mit diesem analytisch außerordentlich wichtigen Ferment haben wir uns schon im Kapitel „Katalyse durch Wasserstoffionen“ des vorausgegangenen Bandes des *Speziellen Teils* bei Anlaß der Rohrzuckerinversion befaßt. Wir stellten damals fest, daß das Wasserstoffion ein vorzüglicher Katalysator der Rohrzuckerinversion ist. Es besitzt nur die in manchen Fällen nachteilige Eigenschaft, daß es auch auf andere Kohlenhydrate, mit denen der Rohrzucker häufig im Gemisch vorliegt, aufspaltend zu wirken vermag, und es gelingt dann nur unter sorgfältiger Beachtung bestimmter Versuchsbedin-

¹⁾ Die Galaktosidoglukose zeigt den Fermenten gegenüber ganz dasselbe Verhalten wie die Melibiose, so daß sich diese beiden Zucker auf dem angegebenen fermentativen Weg nicht auseinanderhalten lassen.

²⁾ Ueber die Bedeutung der auxanographischen Methode zur Erkennung der Laktasespaltung des Milchzuckers siehe im vorigen, S. 36 u. 37.

gungen, die Hydrolyse praktisch auf den Rohrzucker allein zu beschränken. Demgegenüber besitzt der fermentative Katalysator der Rohrzuckerinversion, die Invertase (Invertin), dessen chemische Natur¹⁾ noch ebenso in Dunkel gehüllt ist, wie diejenige der übrigen Fermente, einen streng spezifischen Charakter und vermag daher in

¹⁾ O'Sullivan u. Tompson, Journ. Chem. Soc. 57 (1890) 834, haben zuerst ein Kohlenhydrat, das nach Kölle, Zeitschr. f. physiol. Chem. 29 (1900) 429, Mannose, nach Oshima, Ebenda 36 (1902) 42, außerdem Fucose enthält, als einen wesentlichen Bestandteil der Invertase erkannt. Osborne, Ebenda 28 (1899) 399, sowie Hüfner, Ebenda 42 (1904) 1, konnten ihre Invertasepräparate wohl durch weitgehende Reinigung der Eiweißreaktionen, nicht aber der Kohlenhydratreaktionen berauben, und Mathwes u. Glenn, Journ. of Biol. Chem. 9 (1911) 29, fanden bei der Spaltung von Invertase aus autolyseierter Hefe 70 % Mannose und nur 2 % Stickstoff [siehe ferner Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31 (1901) 305, 61 (1909) 124; Masuda, Ebenda 56 (1910) 143]. Ferner soll nach Tribot, Compt. rend. 147 (1908) 706, Magnesium ein wesentlicher, mit der invertierenden Wirkung zusammenhängender Bestandteil sein. Jedenfalls muß es sich bei der Invertase um ein hochkompliziertes Molekül handeln, wie sich dies durch Berechnung des Molekulargewichts aus der von R. O. Herzog u. Kasarnowski, Zeitschr. f. Elektrochem. 13 (1907) 533; Biochem. Zeitschr. 11 (1908) 172, zu diesem Zweck in Vorschlag gebrachten Messung der Diffusionskonstante (D) von Fermentlösungen ergibt. Nach der Formel von Thover, Compt. rend. 135 (1902) 579, 150 (1910) 270; vgl. auch Riecke, Zeitschr. f. physik. Chem.

6 (1890) 564: $M = \frac{59.2}{D^2}$ findet sich so für das Molekulargewicht M der Invertase 54000, gegenüber 45000 beim Emulsin, 12000 beim Pepsin und 14000 beim Lab. Bei der Berechnung nach Oeholm, Med. k. Vet. Nobelinstitut 2 (1912) 23, entsprechend der Formel $\sqrt{M} = \frac{7.0}{D}$ ergeben sich ähnliche Werte, und zwar: In-

vertase = 44900, Emulsin = 37700, Pepsin = 10000, Lab = 11200. Auch bei Berechnung nach der Gleichung von Einstein, Eine neue Bestimmung der Moleküldimensionen, Dissert., Bern 1905; Ann. d. Physik [4] 19 (1906) 303; Zeitschr. f. Elektrochem. 14 (1908) 237 und v. Smoluchowski, Ann. d. Physik [4] 21

(1906) 756: $D = \frac{R \cdot T}{6 \pi \cdot N} \cdot \frac{1}{\eta \cdot \rho}$ [T = absolute Temperatur, R = Gaskonstante, N = Lohschmidtsche Zahl, die nach Perrin, Compt. rend. 146 (1908) 967, 147 (1908) 131, 530, $7.05 \cdot 10^{23}$ beträgt, ρ = Radius des gelösten Moleküls, η = Viskosität des Lösungsmittels]. Da $Mv = N \cdot \frac{4}{3} \pi \cdot \rho^3$, woraus sich ρ ergibt (v = spez. Vo-

lumen der gelösten Substanz in festem Zustand), ist $M = \frac{R^3}{162 \pi^2 N^2} \cdot \left(\frac{T}{\eta \cdot D} \right)^3 \cdot \frac{1}{v}$

[siehe R. O. Herzog, Zeitschr. f. Elektrochem. 16 (1910) 1003, und in Oppenheimer, Fermente 2 (1913) 877] zeigt die Invertase das höchste Molekulargewicht = 417000 und den höchsten mittleren Molekulardurchmesser = $90 \cdot 10^{-8}$, gegenüber 321000 bzw. $82 \cdot 10^{-8}$ beim Emulsin, 44000 bzw. $42 \cdot 10^{-8}$ beim Pepsin und 52000 bzw. $44 \cdot 10^{-8}$ beim Lab.

dem praktisch vorkommenden Gemisch von Kohlenhydraten nur den Rohrzucker zu hydrolysieren¹⁾).

Der Name Invertin stammt von Donath²⁾, der in seiner grundlegenden Arbeit auch die erste gute Methode zur Darstellung invertierender Fermentpräparate gegeben hat. Danach wird die frische Hefe mit absolutem Alkohol gerieben und nach dem Abpressen des Alkohols unter sorgfältigem Erwärmen getrocknet. Die trockene Masse wird mit Wasser zerrieben, filtriert, das Filtrat mit Aether geschüttelt, die sich abscheidende Gallerte mit Wasser gewaschen, absoluten Alkohol eingetroppt und die sich abscheidenden Flocken mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Eine ältere, nicht mehr gebräuchliche Darstellungsmethode stammt von Berthelot³⁾. Eine Methode von Barth⁴⁾ lieferte in der von Salkowski⁵⁾ empfohlenen Modifikation ein relativ reines, aber wenig aktives Invertasepräparat. Die Methode von Osborne⁶⁾ führt zu einer reinen und stark wirksamen Invertase, doch ist das Verfahren ziemlich umständlich. Wesentlich ist in jedem Fall⁷⁾, daß die Hefezellen zunächst auf irgend eine Weise, sei es durch Erhitzen⁸⁾, durch Plasmolyse⁹⁾, durch Autolyse¹⁰⁾, durch mechanische Zerstörung und Auspressen nach der Buchnerschen Methode der Presssaftgewinnung¹¹⁾, durch Alkohol (angewandt bei den zitierten Methoden), Aether¹²⁾, Glycerin¹³⁾ oder andere Zellgifte abgetötet oder schwer geschädigt werden. Da Hefe und Schimmelpilze auf Zellschädigung prompt mit starker Invertaseabgabe reagieren, so ist auf dieses Verhalten von Kisch¹⁴⁾ eine Methode zur quantitativen Messung der Wirkung von Giften gegründet worden. Vielleicht könnte auch die durch Saccharose und andere Zucker bewirkte starke Vermehrung der Fermentproduktion, welche Grezes¹⁵⁾ festgestellt hat, mit einer Zellschädigung (durch Hyperosmose) in Zusammenhang gebracht werden. Die vermehrte Invertaseabgabe infolge einer solchen Schädigung könnte dann sekundär eine vermehrte Fermentbildung nach sich ziehen. Andererseits wird die häufig einer logarithmischen Kurve¹⁶⁾ folgende Bildung der Invertase aber

1) Bourquelot, Journ. Pharm. Chim. [5] 7 (1883) 131.

2) Donath, Ber. d. chem. Ges. 8 (1875) 795.

3) Berthelot, Compt. rend. 51 (1856) 980.

4) Barth, Ber. d. chem. Ges. 11 (1878) 474.

5) Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31 (1901) 305.

6) Osborne, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28 (1899) 399.

7) Siehe O'Sullivan, Journ. Chem. Soc. London 61 (1892) 593, 926.

8) Salkowski, Virchows Archiv 70 (1877) 158.

9) Issajew, Zeitschr. f. ges. Brauwesen 23 (1900) 796.

10) O'Sullivan u. Tompson, Journ. Chem. Soc. London 57 (1890) 834; Euler u. Kullberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 73 (1911) 335; siehe auch die Methode von Pottevin u. Napias, Soc. Biol. 50 (1898) 237.

11) Wroblewski, Ber. d. chem. Ges. 31 (1898) 1134.

12) Hoppe-Seyler, Ber. d. chem. Ges. 4 (1871) 810.

13) Gunning, Ber. d. chem. Ges. 5 (1872) 821.

14) Kisch, Biochem. Zeitschr. 40 (1912) 152.

15) Grezes, Ann. d. Inst. Pasteur 26 (1912) 556.

16) Siehe Euler u. Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 76 (1912) 394.

umgekehrt gerade durch solche Faktoren günstig beeinflusst, die wie gute Ernährungsverhältnisse¹⁾ und Jugend der Zellen auf alle Lebensprozesse günstig einwirken.

Die Rohrzuckerbestimmung-mittels Invertase.

Was die Anwendung der Invertase zur Rohrzuckerbestimmung betrifft, so führt man die letztere nach Kjeldahl²⁾ in einem Gemisch von Kohlenhydraten mit Hilfe von Invertase in folgender Weise aus: Man ermittelt die Drehung α und das Reduktionsvermögen S der zu untersuchenden Lösung. Hierauf fügt man zu einem bestimmten Volumen der Flüssigkeit, z. B. 50 ccm, wenige Kubikzentimeter einer konzentrierten Invertaselösung³⁾ und überläßt das Reaktionsgemisch 24 Stunden sich selbst bei einer Temperatur von 52°. Statt bei 52° überlassen O'Sullivan und Thompson⁴⁾ die Rohrzuckerlösung bei 55° der Einwirkung der Invertase resp. der invertasehaltigen Hefe, geradeso wie bei der fabrikmäßigen Inversion. Nach der Vorschrift der genannten Autoren werden 50 ccm der möglichst neutralen, keinesfalls aber alkalischen Rohrzuckerlösung in einem Becherglas im Thermostaten auf 55° gebracht, abgepreßte Bierhefe (ca. $\frac{1}{10}$ von dem Gewicht des vorhandenen Rohrzuckers) in dieser Lösung bis zur gleichmäßigen Verteilung der Hefe verrührt und 4 Stunden im Thermostaten belassen. Hierauf wird das Reaktionsgemisch auf 15,5° C abgekühlt, eventuell mit Aluminiumhydroxyd zur Klärung versetzt, auf 100 ccm aufgefüllt, ein kleiner Teil abfiltriert und polarisiert. Der Rest der Flüssigkeit wird am folgenden Tag der polarimetrischen Untersuchung unterworfen, um festzustellen, ob die Inversion vollständig war. Nun bestimmt man das Reduktionsvermögen der Flüssigkeit gegenüber der alkalischen Kupferlösung in gewohnter Weise. Hierauf bringt man die Flüssigkeit auf 100 ccm, filtriert sie, bestimmt abermals die Drehung (bei 20° C) und das Reduktionsvermögen und bezieht die erhaltenen Werte auf das ursprüngliche Volumen der Lösung. Die so gefundenen Werte α' und S' für Drehung und Reduktionsvermögen werden von α und S subtrahiert und die Differenzen $\alpha - \alpha'$ und $S' - S$ gestatten die Berechnung der Rohrzuckerquantität. Aus 1 % Rohrzucker mit der spezifischen Drehung $[\alpha]_D = 66,6$ und dem Reduktionsvermögen 0 entsteht 1,05 % Invertzucker, der bei 20° C die spezifische Drehung $[\alpha]_D = -21,5^\circ$ besitzt und die Fehlingsche Lösung reduziert. Für je 1 % Rohrzucker ergibt sich daher die Differenz des Rotationsvermögens zu

$$\alpha - \alpha' = 0,666 + 0,215 \cdot 1,05 = 0,892^\circ.$$

Die Differenz des Reduktionsvermögens ergibt für je 1 % Rohrzucker 1,05 % durch Titration ermittelten Invertzucker. $S' - S$ ist demnach für je 1 % = 1,05%. Man erhält also die Menge des vorhandenen Rohrzuckers, wenn man die Differenz der Drehungen vor und nach der Invertinbehandlung mit 0,892 dividiert, oder wenn man die Differenz der titrimetrisch erhaltenen Werte mit 1,05 dividiert. Um ganz sicher zu gehen, ist ein Kontrollversuch mit Invertin anzustellen, das

¹⁾ Effront-Bücheler, Die Diastasen, Leipzig 1900, S. 74; Euler u. H. Meyer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 79 (1912) 274.

²⁾ Kjeldahl, Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, 3. Heft, Kopenhagen 1881, S. 339 resp. 189.

³⁾ Kjeldahl benutzt einen wäßrigen Auszug der gut ausgewaschenen Hefe.

⁴⁾ O'Sullivan u. Thompson, Journ. Chem. Soc. 59 (1891) 46.

auf 100° erhitzt worden ist. Sollte dieses eine geringe Veränderung bedingen, so muß dieselbe von der beim Hauptversuch beobachteten abgezogen werden.

Praktisch analytisch kommt die Rohrzuckerinversion mittels Invertase vor allem bei der Untersuchung von kondensierter Milch in Anwendung, da das Invertin nach Bigelow und Mc Elroy¹⁾ mit der Zitronensäure²⁾ die Eigentümlichkeit teilt, nur den Rohrzucker, nicht aber den Milchzucker zu spalten³⁾.

Die Ermittlung der Invertase.

War im vorigen die Invertase lediglich nur Mittel zum Zweck, so kann es sich in anderen Fällen um ihre eigene Bestimmung handeln. Schon die Verwendung der Invertase als Hilfsmittel der analytischen Praxis in allen einschlägigen Gebieten erfordert eine Kontrollierung des Wirkungswertes von Invertasepräparaten⁴⁾. Nach Euler, Lindberg und Melander⁵⁾ geschieht dies in der Weise, daß man 0,05 g des zu prüfenden Präparates in 5 ccm einer $\frac{1}{2}$ normalen Lösung des sauren Natriumphosphats NaH_2PO_4 auflöst, auf 20 ccm einer 20%igen Rohrzuckerlösung bei 20° einwirken läßt und den Abfall der Rechtsdrehung im Polarisationsapparat verfolgt. Die Zeit (in Minuten angegeben), die bis zum Herabgehen der Drehung auf 0° verstreicht, ist dann das Maß für die Wirksamkeit eines Invertasepräparates, wobei nicht unterlassen werden darf, die Multirotation durch Sodazusatz aufzuheben⁶⁾. Auch muß, wenn Trübungen im

¹⁾ Bigelow u. Mc Elroy, Journ. Amer. Chem. Soc. 15 (1893) 668; siehe auch über die Rohrzuckerinversion in kondensierter Milch durch Invertase: J. B. P. Harrison, The Analyst 29 (1907) 248.

²⁾ Siehe das Kapitel: „Katalyse durch Wasserstoffionen“.

³⁾ Nach Bigelow u. Mc Elroy, loc. cit. vorletzte Fußnote, werden 25 g kondensierte Milch in einem Kölbchen von 100 ccm Inhalt mit Wasser übergossen, im Wasserbad auf 55° erhitzt, mit Preßhefe versetzt und 5 Stunden bei der nämlichen Temperatur belassen. Statt Preßhefe verwenden Grünhut u. Ribber, Zeitschr. f. anal. Chem. 39 (1900) 19, einen mit alkoholischer Thymollösung versetzten Hefebrei (Kjeldahlvorschrift). Sie ziehen jedoch die Säureinversion vor wegen der ungleichen Wirksamkeit des Hefebreis und der dadurch gegebenen Schwierigkeit der Dosierung.

⁴⁾ Gleichviel, ob die Invertase darin das einzige Enzym sei oder wie beim Malzextrakt [siehe Brown u. Heron, Journ. Chem. Soc. 35 (1879) 609; Vandevelde, Biochem. Zeitschr. 28 (1910) 131] im Gemisch mit anderen Enzymen vorliegt.

⁵⁾ Euler, Lindberg u. Melander, Zeitschr. f. physiol. Chem. 69 (1910) 152.

⁶⁾ Siehe im folgenden.

Reaktionsgemisch während des Versuchs infolge eines Eiweißgehaltes der Fermentlösung zu befürchten sind, vor jeder Polarisation die erforderliche Flüssigkeitsmenge enteiweißt werden ¹⁾. Gute Präparate sollen in 10—15 Minuten zu dem angegebenen Inversionsgrad führen.

Statt der polarimetrischen Methode kann für die Invertasermittlung auch das Reduktionsverfahren in Anwendung kommen, bei dem das Reduktionsvermögen des bei 30—35° gehaltenen Reaktionsgemisches nach bestimmten Zeiten an völlig enteiweißten Proben bestimmt wird. Für die Praxis der Invertasebestimmung empfiehlt Wohlgemuth ²⁾ namentlich die Titrationsmethoden von Bang ³⁾ und Bertrand ⁴⁾, doch ist auch die Bestimmung mittels gewöhnlicher Fehlingscher Lösung im Gebrauch ⁵⁾.

Die Invertase erfährt durch ihre Tätigkeit keine Schädigung und ist daher nach O'Sullivan und Tompson ⁶⁾ instande, unbegrenzte Rohrzuckermengen zu invertieren, vorausgesetzt, daß die Rohrzuckerkonzentration nicht so hoch ist, daß sie das Ferment zu schädigen vermag ⁷⁾. Auch die Inversionsprodukte sind nach den genannten Autoren einflußlos, was allerdings von anderer Seite ⁸⁾ bestritten wird.

¹⁾ Ueber die gebräuchlichen Methoden zum Enteiweißen bei Fermentuntersuchungen siehe Schenk, Pflügers Archiv 55 (1893) 203; Michaelis u. Rona, Biochem. Zeitschr. 7 (1908) 329; Oppler u. Rona, Ebenda 13 (1908) 122.

²⁾ Wohlgemuth, Grundriß der Fermentmethoden, Berlin 1913, S. 72.

³⁾ Bang, Biochem. Zeitschr. 2 (1907) 271, 11 (1908) 538, 32 (1911) 443. 49 (1913) 1.

⁴⁾ Bertrand, Bull. Soc. Chim. Paris [3] 35 (1906) 1285.

⁵⁾ Siehe Moreau, Ann. des falsifications 4 (1911) 145.

⁶⁾ O'Sullivan u. Tompson, Journ. Chem. Soc. 57 (1890) 835.

⁷⁾ So gibt v. Fellenberg, Mitteil. f. Lebensmittelunters. u. Hygiene 2 (1911) 376, an [im Anschluß an die Erwähnung eines Befundes von Witte, Zeitschrift f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 23 (1911) 323, daß Rohrzucker, der einem invertasereichen Honig zugesetzt wird, nach einigen Tagen (bei 45°) größtenteils invertiert worden sei], daß die Invertase in einem solchen Gemisch wahrscheinlich vollständig verschwinde, was einen Rückschluß auf die Unreellität des betreffenden Produktes gestatte.

⁸⁾ Gegenteilige Angaben bei Omeis, Inaug.-Dissert., Erlangen 1889; Armstrong, Proc. Royal Soc. London 73 (1904) 500, 516, 526, findet nur für die Lävulose eine Verzögerung, während V. Henri auch die Dextrose wirksam findet, wenngleich weit schwächer als die Lävulose. Doch auch Zucker, die mit der Inversion nichts zu tun haben, namentlich die Galaktose, wirken hemmend. Die letztere steht in bezug auf ihre hemmenden Fähigkeiten zwischen Traubenzucker und Fruchtzucker. Die Invertasen verschiedenen Ursprungs scheinen übrigens für diese Hemmungswirkungen ungleich empfindlich zu sein; so soll Invertase aus Kefirhefe eine geringere Verzögerung erleiden als diejenige gewöhnlicher Hefe. Vgl. auch

Die Frage ist analytisch namentlich für die Invertasebestimmung im Honig¹⁾ nicht bedeutungslos, wenn diese wichtige Echtheitsprüfung nicht an den durch Alkohol aus dem Honig abgeschiedenen Enzymen²⁾, sondern an diesem letzteren selbst ausgeführt wird, wie dies v. Fellenberg (loc. cit.) versucht hat, der die 1%igen Honiglösungen während zwei Tagen sich selbst überläßt und dann die bei echten Honigen zwischen 0,27—6,4 % betragende Invertzuckerzunahme³⁾ bestimmt. Jedenfalls vermögen verschiedene andere auch praktisch in Betracht kommende Substanzen die fermentative Tätigkeit der Invertase zu hemmen. Die Ursachen von Hemmungswirkungen sind noch nicht geklärt. Die Annahme, daß das Ferment durch die schädigenden Stoffe gebunden werde, spielt eine große Rolle, selbst für Körper, die, wie die Inversionsprodukte und andere Zucker, sonst durchaus nicht durch eine besondere Tendenz zum Eingehen chemischer Verbindungen ausgezeichnet sind⁴⁾.

Bei aller Anerkennung der Wahrscheinlichkeit, daß chemische Bindungen des öfteren ein Ferment zu inaktivieren vermögen, möchte die Verfasserin bei der Invertase wie bei anderen Fermenten zunächst die kolloidchemische Beeinflussung des Enzyms in Berücksichtigung ziehen. Wie der Temperatureinfluß von diesem Gesichtspunkt aus gewürdigt werden muß, so auch der Einfluß von Säuren, Basen und Salzen, die den Grad des Auflockerungszustandes, der wohl die Wirkung eines Fermentes unmittelbar beeinflusst, nach den Grundgesetzen der Kolloidchemie zu variieren vermögen. Für die Salze bildet das Studium der Wechselwirkung von Kolloiden und Ionen die zurzeit

im folgenden die Ansichten von Henri, Michaelis und Menten über Invertasebindung an die Reaktionsprodukte.

¹⁾ Ueber die Honiginvertase siehe Langer. Archiv f. Hygiene 71 (1909) 308; Moreau, Ann. des falsifications 4 (1911) 65, 145; v. Fellenberg, Mitteil. f. Lebensmittelunters. u. Hygiene 2 (1911) 161, 369.

²⁾ Moreau loc. cit. vorige Fußnote, ermittelt die Honiginvertase in der Weise, daß er sie mit Alkohol abscheidet, in Lösung bringt, mit einer der optimalen Säurekonzentration entsprechenden Menge Ameisensäure versetzt, Rohrzucker hinzufügt und nach 4 Tagen den reduzierenden Zucker mit Fehling'scher Lösung bestimmt.

³⁾ Echte Honige, die eine so starke Erhitzung durchgemacht haben, daß die hydrolysierenden Honigfermente abgetötet worden sind, zeigen wie die Kunsthonige keine Zunahme ihres Reduktionsvermögens beim Stehen der wäßrigen Lösung. Sie sind in diesem Fall nicht mehr als vollwertige Produkte anzusehen (vgl. das über die Fiehesche Reaktion in der ersten Abteilung des Spez. Teils Ausgeführte).

⁴⁾ Siehe im folgenden.

einzige Möglichkeit, um statt des Durcheinanders von Einzelbeobachtungen (die, unter meist unzureichend definierten Bedingungen angestellt, zu den widerspruchsvollsten Literaturangaben geführt haben) eine wissenschaftliche Basis für die systematische Durchforschung dieses dunkeln Gebiets der Enzymologie zu gewinnen¹⁾.

Was die Schädigung der Hefeinvertase durch Temperaturerhöhung betrifft, welche nach Euler u. Beth af Ugglas²⁾ entsprechend der monomolekularen Gleichung

$$k_E = \frac{1}{t} \log \frac{E}{E-y}$$

erfolgt, in der E die ursprüngliche Enzymkonzentration, y die Enzymkonzentration zur Zeit t, und k_E die Inaktivierungskonstante bedeutet, so wird sie weitgehend durch die Reaktion des Mediums beeinflusst. Während in neutraler Lösung bzw. bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration nach Euler und Kullberg³⁾ 63° zur Zerstörung der Hälfte des vorhandenen Ferments (wirkliche Tötungstemperatur) notwendig sind, kann eine bestehende Alkaleszenz des Mediums offenbar für die Angaben verantwortlich gemacht werden, nach welchen der Invertase bei Abwesenheit ihres sie spezifisch schützenden Substrates⁴⁾, des Rohrzuckers, und mehr noch ihres nach Henri⁵⁾ durch besonders hohes Bindungsvermögen ausgezeichneten Spaltprodukts, der Lävulose⁶⁾ [Laktose schützt die Invertase im (Gegensatz zu der Angabe von Hudson⁷⁾ nach Euler und Kullberg⁸⁾ nur wenig] eine außerordentliche Temperaturempfindlichkeit zuzuschreiben sei. So soll nach Masuda⁹⁾ Hefeextrakt schon bei Zimmertemperatur in 25 Stunden 70% seiner Wirkung einbüßen. Die Begünstigung der Inaktivierung durch Hydroxylionen und Temperaturerhöhung ist übrigens eine gegenseitige, da die Temperatursteigerung die Hydroxylionenwirkung beschleunigt. Außer der Reaktion des Mediums könnte auch die Individualität der Hefeinvertase die Temperaturempfindlichkeit beeinflussen, wie dies die allerdings von Euler und Johansson¹⁰⁾ bestrittene ältere Angabe über ein um 25° höher gelegenes Temperaturoptimum von obergäriger Hefe gegenüber untergäriger Hefe nahelegen würde.

¹⁾ Ueber die Beeinflussung der Invertasewirkung durch Neutralsalze siehe Cole, Journ. of Physiol. 30 (1904) 281, durch Schwermetallsalze (Quecksilbersalze) sowie Zyankalium Duclaux, Ann. Inst. Pasteur 11 (1897) 348; Bau. Wochenschr. f. Brauerei 20 (1903) 560.

²⁾ Euler u. Beth af Ugglas, Zeitschr. f. physiol. Chem. 65 (1910) 124; siehe ferner schon Tammann, Zeitschr. f. physik. Chem. 18 (1895) 426; loc. cit. im *Allg. Teil*, S. 157 ff.

³⁾ Euler u. Kullberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71 (1911) 134.

⁴⁾ A. Mayer, Enzymologie, Heidelberg 1882, S. 23; Zeitschr. f. ges. Brauwesen (1882) 86.

⁵⁾ Henri, loc. cit. S. 57.

⁶⁾ A. Jodlbauer, Biochem. Zeitschr. 3 (1907) 482.

⁷⁾ Hudson, Journ. Amer. Chem. Soc. 32 (1910) 985.

⁸⁾ Euler u. Kullberg, loc. cit. Fußnote 3, diese Seite.

⁹⁾ Masuda, Zeitschr. f. physiol. Chem. 66 (1910) 143.

¹⁰⁾ Euler u. Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 76 (1912) 388.

Die Schädigung durch Licht ist von der durch Temperaturerhöhung bewirkten scharf zu unterscheiden. Hier handelt es sich, gleichviel ob eine Sensibilisierung durch Farbstofflösungen wie Eosin ¹⁾ im Spiele ist oder nicht, um einen prinzipiell andersartigen Vorgang. Das Ferment wird bei dieser Schädigung nicht physikalisch durch Beeinflussung seines kolloiden Zustands gefaßt, wie dies bei der Temperaturerhöhung der Fall ist, sondern chemisch durch Begünstigung seiner Oxydation durch den Sauerstoff der Luft, dessen hemmende Wirkung auf Invertase schon Nasse ²⁾ aufgefallen war. Nur ultraviolette Strahlen zeigen auch bei Sauerstoffmangel eine allerdings schwächere direkte Wirkung auf das Ferment ³⁾.

Für Säuren und Basen kommen zu der kolloidchemischen Beeinflussung noch andere wichtige Faktoren hinzu. Während sich in der hier und dort zutage tretenden Bedeutung des Anions bei Säuren und des Kations bei Basen der Einfluß der Eigenart irgend einer Kombination von Kation und Anion gegenüber dem kolloiden Ferment fühlbar macht, kommt in anderen Fällen einzig das Wasserstoffion in Betracht ⁴⁾, wie dies Stoward ⁵⁾ für die Einwirkung von Säuren auf Invertase feststellen konnte, und wie dies durch die Formel ⁶⁾ zum Ausdruck gebracht wird, welche Hudson ⁷⁾ für die Abhängigkeit der Aktivität der Invertase von der Wasserstoffionenkonzentration aufgestellt hat. Die Wirkung des Wasserstoffions würde nach Michaelis und seinen Mitarbeitern ⁸⁾ darin bestehen, daß die wirksame Invertinsäure durch Wasserstoffionen aus einer Vorstufe in Freiheit gesetzt wird. Bei der Invertinsäure überwiegt die Säure-

¹⁾ Siehe über die photodynamische Wirkung das Kapitel Physikalische Faktoren in der Katalyse im *Allg. Teil*, S. 388—391.

²⁾ Nasse, Pflügers Archiv **11** (1875) 147, **15** (1879) 471.

³⁾ Jodlbauer, Biochem. Zeitschr. **3** (1907) 482, 488; Hannes u. Jodlbauer, Ebenda **21** (1909) 110.

⁴⁾ Die so gut wie undissoziierte Borsäure ist daher, wie Béchamps, *Compt. rend.* **75** (1872) 837, zeigen konnte, wirkungslos.

⁵⁾ Stoward, Biochem. Journ. **6** (1911) 131.

⁶⁾
$$\text{Aktivität} = \frac{a}{\frac{1 + K_2(\text{H}^+)}{K_w} + \frac{K_1}{(\text{H}^+)}}$$

es bedeutet darin K_w die Dissoziationskonstante des Wassers. Die Unbekannten K_1 , K_2 und K_w sowie a müssen experimentell aus der Invertaseaktivität bei drei verschiedenen Salzsäurekonzentrationen ermittelt werden.

$K_1 = 0,000086$; $a = 77 \frac{K_2}{K_w} = 133$.

⁷⁾ Hudson, Journ. Amer. Chem. Soc. **32** (1910) 1220; Hudson u. Paine, Ebenda **32** (1910) 774.

⁸⁾ Michaelis u. Ehrenreich, Biochem. Zeitschr. **10** (1908) 283, **33** (1911) 132; Isoelektrischer Punkt elektroamphoterer Kolloide. Nernst-Festschr. 1912, S. 308; Michaelis u. Davidsohn, Biochem. Zeitschr. **35** (1911) 386.

dissoziationskonstante $= 2 \cdot 10^{-7}$, die Basendissoziationskonstante $= 10^{-12}$ um ein bedeutendes; sie ist aber nichtsdestoweniger so gering, daß in Gegenwart freier Wasserstoffionen die Dissoziation völlig zurückgedrängt werden muß. Da nun nur die undissoziierten Moleküle der Invertinsäure Träger ihrer invertierenden Eigenschaften sind, so könnte die Auffassung von Michaelis dahin interpretiert werden, daß die Aktivierung durch Wasserstoffionen gleichbedeutend mit der Vermehrung der Zahl der wirksamen undissoziierten Moleküle wäre. Erst ein Ueberschuß an Wasserstoffionen schädigt das Ferment aus dem vorhin erwähnten kolloidchemischen Grund.

Die entgegengesetzte Wirkung würde dagegen, abgesehen von der kolloidchemischen Komponente, auf das Auftreten von unwirksamen Anionen hindeuten, die bei der Bildung des stark dissoziierten Alkalisalzes der Invertinsäure entstehen.

Das Optimum der Fermentwirkung wäre also beim Invertin, wie bei anderen als undissoziiertes Molekül wirkenden Fermenten, bestimmt durch den isoelektrischen Punkt, dessen Lage sich aus der Formel von Michaelis¹⁾

$$J = \sqrt{\frac{k_s}{k_b}} \cdot k_w$$

berechnet²⁾.

Es bedeutet darin k_s die Säuredissoziationskonstante, k_b die Basendissoziationskonstante und k_w die Dissoziationskonstante des Wassers.

Auf die grundlegende Bedeutung des isoelektrischen Punktes, der durch die gleiche Konzentration der Kationen und Anionen des amphoteren Elektrolyten und damit durch das Fehlen einer kataphoretischen Wanderung ausgezeichnet ist, hat dann vor allem auch Sørensen³⁾ hingewiesen. Er hat gezeigt, wie man für irgendwelche Wasserstoffionenkonzentration das Verhältnis des undissoziierten Teils x zur Gesamtmenge A des amphoteren Elektrolyten, das er als Dissoziationsrest bezeichnet, berechnen kann, wenn Säure- und Basendissoziationskonstante k_s und k_b bekannt sind. Danach ist der Dissoziationsrest

$$\frac{x}{(A)} = \frac{1}{\frac{1 + k_s}{(H')} + \frac{k_b \cdot (H')}{k_w}} \quad 4).$$

¹⁾ Michaelis, Biochem. Zeitschr. 33 (1911) 185.

²⁾ Ueber Verschiebung des isoelektrischen Punktes durch Verunreinigungen siehe Pekelharing u. Ringer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 75 (1911) 282.

³⁾ Sørensen, Ergebnisse d. Physiol. 12 (1912) 393, 451.

⁴⁾ $\frac{k_w}{(H')}$ ist gleichbedeutend mit (OH') .

Handelt es sich um eine ausgesprochene Säure, so geht die allgemeine Gleichung für den Dissoziationsrest in die spezielle über:

$$\frac{x}{(A)} = \frac{1}{1 + \frac{k_s}{(H^+)}}$$

und dasselbe ist der Fall bei einer ausgesprochenen Base, bei welcher zu setzen ist für

$$\frac{x}{(A)} = \frac{1}{1 + \frac{k_b(H^+)}{k_w}}$$

Im isoelektrischen Punkt, in dem

$$\frac{k_s}{k_b} = \frac{(H^+)}{(OH^+)}$$

erreicht der Dissoziationsrest sein Maximum.

Neben der Beeinflussung des Fermentes dürfte bei Säuren und Basen die Beeinflussung des Substrats in Frage kommen, da anzunehmen ist, daß die bei der Glukose usw. beobachteten Erscheinungen der Multirotation — jener durch Säuren und in noch höherem Grade durch Basen beschleunigten Moleküländerung — sich auch den Kondensationsprodukten, die das Glukosemolekül enthalten, mitteilen und Änderungen der Spaltbarkeit dieser Produkte im Gefolge haben.

Ganz anderer Art sind wohl die Hemmungen, die Mereshkowsky¹⁾ bei der Einwirkung von Farbstoffen (Safranin, Kongorot, Fuchsin) auf die Invertase konstatierte. Sie könnten in Vorgängen gegenüber dem kolloiden Ferment begründet sein, die dem Aufziehen der Farbstoffe auf der Faser ähnlich sind. Noch unsicherer liegen die Verhältnisse bei der nur in saurer Lösung hemmenden Galle²⁾ und beim Formaldehyd³⁾, während für die Wirkung von hochprozentigen Rohrzuckerlösungen⁴⁾ und von Alkohol⁵⁾ wiederum die Beeinflussung des kolloiden Charakters des Ferments zur Erklärung der Hemmungswirkung herangezogen werden kann. Was den Alkohol anbetrifft, so wird nach O'Sullivan und Thompson⁶⁾ in einer 5%igen alkoholischen Lösung die invertierende Fähigkeit des Fermentes auf die

¹⁾ Mereshkowsky, Zentralbl. f. Bakt. [2] 11 (1903) 33.

²⁾ Spaleitta, Arch. di Farmacol. sperm. (1905) Heft 5; Biochem. Zentralbl. 4 (1906) 1711.

³⁾ Bokorny, Chem.-Ztg. 26 (1902) 701.

⁴⁾ Derselbe, Ebenda 27 (1903) 1106.

⁵⁾ Hudson u. Paine, Journ. Amer. Chem. Soc. 32 (1910) 1350.

⁶⁾ O'Sullivan u. Thompson, loc. cit. Fußnote 6, S. 45; siehe ferner Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31 (1901) 306.

Hälfte herabgesetzt. Hudson und Paine¹⁾ haben für die Rohrzuckerinversion in Gegenwart des Invertase zerstörenden Alkohols die Formel aufgestellt:

$$\log \frac{a}{a-x} = \frac{K_1}{K_2} (J - e^{-K_2 \cdot t}).$$

Es bedeuten in dieser Formel K_1 die Inversionsgeschwindigkeit, K_2 die der Zerstörung entsprechende Konstante, J die Menge Invertase und a die Menge Rohrzucker.

Bei der Bestimmung des Invertins im Bier²⁾ sowie im Wein³⁾, dessen Spaltungsvermögen gegenüber Rohrzucker zum Teil auf dem Gehalt an diesem Ferment beruht, muß mit dieser Hemmungswirkung des Alkohols gerechnet werden, während die Hemmungswirkung durch Alkali und der umgekehrte Einfluß der Säuren⁴⁾ ganz allgemein bei der Prüfung aller in der Natur vorkommenden Säfte auf einen Invertingehalt nicht übersehen werden darf.

Jeder Prüfung auf Invertase in irgendeiner Flüssigkeit tierischen oder pflanzlichen Ursprungs sollte daher eine Feststellung ihrer Reaktion vorausgehen. Wenn auf diesen Punkt systematisch geachtet wird, so wäre es nicht unmöglich, daß sich da und dort das bei manchen Bakterien und Pilzen dauernd oder zeitweise fehlende Vermögen, ein so wichtiges Nährmaterial wie den Rohrzucker aufzuspalten, als Folge einer Alkaleszenz des betreffenden Saftes ergibt, da schon die geringsten Quantitäten überschüssiger Hydroxylionen (OH' -Konzentration = 10^{-6}) die Rohrzuckerinversion durch Invertase völlig hemmen. Wie schon im Allg. Teil hervorgehoben wurde, hat also die Natur in der variierbaren Alkaleszenz und Azidität der Säfte einen wichtigen regelnden Mechanismus gegeben, der noch dadurch an physiologischer Bedeutung gewinnt, daß schon die Kohlensäure, wie Nasse (loc. cit.) gefunden hat, durch Neutralisation von Alkali die Invertasewirkung zu begünstigen vermag.

Ein Verfahren, nach welchem Bakterien auf einen Invertase-

¹⁾ Hudson u. Paine, loc. cit. vorige Seite, Fußnote 5; Fernbach, Ann. Inst. Pasteur 4 (1890) 1; vgl. auch Pavy u. Bywaters, Journ. of Physiol. 41 (1910) 168.

²⁾ Bau, Wochenschr. f. Brauerei 19 (1902) 44.

³⁾ Es kommt jedoch nur jüngerer Wein in Betracht, da nach Müller-Thurgau, Landwirtsch. Jahrb. 14 (1885) 795, in vollständig abgeklärtem Wein keine Invertase mehr vorhanden ist.

⁴⁾ Thompson, Trans. Laboratory Club 2, 63; Ref. Zeitschr. f. anal. Chem. 33 (1894) 243–247; Fernbach, Ann. Inst. Pasteur 4 (1890) 1; vgl. auch Pavy u. Bywaters, Journ. Physiol. 41 (1910) 168.

gehalt geprüft werden können, ist nach Fermi und Montesano¹⁾ das folgende: Die Bakterienkultur wird filtriert, hierauf werden 5 ccm der Kulturflüssigkeit mit Phenol und Rohrzucker versetzt und nach 14 Tagen auf reduzierenden Zucker untersucht. Da sich jedoch auf diese Weise nur in wenigen Fällen²⁾ Invertase nachweisen läßt, so betrachtet Czapek³⁾ als einen brauchbaren Maßstab für eine vorhandene Invertaseproduktion einfach das Vermögen eines Mikroorganismus, Rohrzucker zu verarbeiten.

In Gramineen und anderen Phanerogamen hat O'Sullivan⁴⁾ die Invertase nach der Behandlung der Wurzeln, Stengel und Blätter mit einer mit Chloroform gesättigten Rohrzuckerlösung bei ca. 50°⁰ mittels der stattgefundenen Rohrzuckerspaltung nachgewiesen und gemessen. Damit ist zugleich der Anfang für eine quantitative Bestimmung der Invertase an ihren natürlichen Bildungsstätten geschaffen worden.

Außer in den schon genannten Organismen, unter denen den Hefen⁵⁾ die größte Bedeutung zukommt und wo die invertierende Fähigkeit auch zuerst entdeckt⁶⁾ und am häufigsten untersucht worden ist⁷⁾, findet sich die Invertase, wie Béchamps⁸⁾ feststellte, in Schimmelpilzen, wenn sie auf ihre Reservestoffe angewiesen sind, in der Pilzgattung *Fusarium* (Wasserzug)⁹⁾ während der Konidienbildung, im *Bacillus mesentericus vulgatus*, im *Bac. proteus*, im *Bac. fluorescens liqu.*, im *Bac. megatherium*, im *Bac. prodigiosus*, im *Bact. aceti*, im *Cholera-vibrio*¹⁰⁾, in Algen¹¹⁾, z. B. in der Alge *Leuconostoc mesenterioides*, die auf

¹⁾ Fermi, Centr. Bakt. 12 (1892) 714; Fermi u. Montesano, Ebenda [2] 1 (1895) 482, 542; siehe auch Manfredi, Just. Jahresber. 1 (1887) 109.

²⁾ Z. B. bei *Bacillus megatherium*.

³⁾ Czapek, Biochemie der Pflanzen 1 (1905) 275.

⁴⁾ O'Sullivan, Proc. Chem. Soc. 16 (1900) 61.

⁵⁾ Die Invertase fehlt nur dem *Schizosacharomyces octosporus*, dem *Sacharomyces apiculatus* sowie manchen Torulaceen, während die *Monilia candida* das Enzym enthält, dasselbe aber nur bei besonderer Behandlung abzugeben vermag. Siehe Emil Fischer u. Lindner, Ber. d. chem. Ges. 28 (1895) 3034; Zeitschrift f. physiol. Chem. 26 (1898) 77; Buchner u. Meisenheimer, Ebenda 40 (1903) 167.

⁶⁾ Dumas u. Boullay, Ann. Chim. Phys. 37 (1828) 45.

⁷⁾ Siehe Kalanthar, Zeitschr. f. physiol. Chem. 26 (1898) 89; Lindner, Wochenschr. f. Brauerei (1900) Heft 48 ff.; Will, Zentralbl. f. Bakt. [2] 34 (1912) 1.

⁸⁾ Béchamps, Compt. rend. 46 (1858) 44; siehe auch Gayon, Compt. rend. 86 (1878) 52; Bourquelot, Journ. Pharm. Chim. [6] 16 (1902) 578 u. Fernbach, loc. cit.

⁹⁾ Ann. Inst. Pasteur 1 (1886) 525.

¹⁰⁾ Ueber das Vorkommen von Invertase bei Bakterien siehe Fermi, loc. cit.; Fuhrmann, Bakterienenzyme, Jena 1907; Kruse, Allg. Mikrobiol., Leipzig 1910, S. 232.

Rübensaft wächst, in der Zuckerrübe selbst, wo sie Robertson, Irvine und Dobson¹⁾ in Blatt und Stengel voranden, während sie sich in der Wurzel nach Ruhland²⁾ bei traumatischer Reizung regulatorisch bildet. Hier spielt die Invertase bei der anaeroben Atmung durch Ueberführung des Rohrzuckers in Traubenzucker, der dann weiter vergärt, eine Rolle³⁾. In Phanerogamen kommt der Invertase überhaupt entsprechend dem häufigen Vorkommen des Rohrzuckers die größte Verbreitung zu⁴⁾. Besonderes Interesse verdient das Vorkommen der Invertase in der Dattel, von welcher sie im unreifen Zustand, ähnlich wie von der *Monilia candida*, festgehalten wird, während sie bei der Reifung durch eine Art autolytischen Prozeß frei wird⁵⁾.

Von nicht geringerer Bedeutung ist das Vorkommen der Invertase im Tierreich. Als wichtiges verdauendes Enzym findet sie sich im Darmsaft, dessen invertierende Fähigkeiten Claude-Bernard⁶⁾ erkannte. Die weitere Untersuchung der Darminvertase ist an die Namen v. Mering⁷⁾, Röbmann⁸⁾, Emil Fischer und Niebel⁹⁾, Grünert¹⁰⁾, Miura¹¹⁾, Köbner¹²⁾, Krüger¹³⁾, Widdicombe¹⁴⁾, Brown und Heron¹⁵⁾, Mendel und Mitchell¹⁶⁾ sowie Bierry¹⁷⁾ geknüpft. Im Magensaft ist dagegen nach Lusk¹⁸⁾ keine Invertase vorhanden, normalerweise auch nicht im Speichel und Pankreas¹⁹⁾; doch gibt Jona²⁰⁾ für

¹¹⁾ Kosmann, Bull. Soc. Chim. 27 (1877) 251.

¹⁾ Robertson, Irvine u. Dobson, Biochem. Journ. 4 (1909) 258.

²⁾ Ruhland, Zeitschr. d. Vereins deutsch. Zuckerind. (1912) 1—19; Zentralbl. f. Biochem. 13 (1912) 1307.

³⁾ Stoklasa, Jelinek u. Vitek, Hofmeisters Beitr. 3 (1903) 460.

⁴⁾ Siehe Béchamps, Compt. rend. 59 (1864) 496; v. Planta, Bienenzeitung (1879) 12; Kosmann, Compt. rend. 81 (1875) 406; van Tieghem, Bull. Soc. Bot. de France 33 (1886) 216; Brown u. Morris, Transact. Chem. Soc. 63 (1893) 604; Kastle u. Clark, Amer. Chem. Journ. 30 (1903) 422; Wortmann, Biol. Zentralbl. 3 (1883) 263; Molliard, Bull. Soc. Bot. de France 55 (1908) 636.

⁵⁾ Vgl. Vinson, Journ. Amer. Chem. Soc. 30 (1908) Nr. 6; Mathews u. Glenn, Journ. Biol. Chem. 9 (1911) 29.

⁶⁾ Claude-Bernard, Leçons sur le diabète, Paris 1887, S. 259.

⁷⁾ v. Mering, Zeitschr. f. physiol. Chem. 5 (1881) 185.

⁸⁾ Röbmann, Pflügers Archiv 41 (1887) 424.

⁹⁾ Emil Fischer u. Niebel, Berliner akad. Ber. 5 (1896) 73.

¹⁰⁾ Grünert, Zentralbl. f. Physiol. 5 (1891) 285.

¹¹⁾ Miura, Zeitschr. f. Biol. 32 (1895) 277.

¹²⁾ Köbner, Zeitschr. f. Biol. 33 (1896) 404.

¹³⁾ Krüger, Zeitschr. f. Biol. 37 (1899) 229.

¹⁴⁾ Widdicombe, Journ. Physiol. 28 (1902) 174.

¹⁵⁾ Brown u. Heron, Ann. Chem. 204 (1880) 228.

¹⁶⁾ Mendel u. Mitchell, Amer. Journ. Physiol. 20 (1907) 81.

¹⁷⁾ Bierry, Biochem. Zeitschr. 44 (1912) 415.

¹⁸⁾ Lusk, Proc. Amer. Physiol. Soc., Philadelphia, 29./30. Dezember 1903; Biochem. Zentralbl. 2 (1904) 821.

¹⁹⁾ v. Mering, loc. cit.; Brown u. Heron, loc. cit.; Bierry, loc. cit.; Lisbonne. Soc. Biol. 68 (1910) 983.

den Speichel und Vandeveld¹⁾ für Pankreasextrakt an, daß Invertase nach dem Kauen von Rohrzucker darin auftreten könne. Es würde sich dann wohl um eine der Bildung von Abwehrfermenten gewissermaßen an die Seite zu stellende Erscheinung handeln, wie sie im Blut der höheren Tiere nach Injektion von Rohrzucker und Milchzucker, nicht aber von Raffinose²⁾ (Abderhalden), im Gegensatz zu Mendel und Kleiner³⁾, Abderhalden und Kapfberger⁴⁾, Abderhalden und Rathsmann⁵⁾, Abderhalden⁶⁾ feststellen konnten, nicht jedoch in normalem Blut⁷⁾. Des weiteren wurde Invertase gefunden in den meisten Organen⁸⁾ und endlich im Verdauungskanal der Insekten⁹⁾.

Die Bedeutung der Theorie der Invertasewirkung für die Invertasebestimmung.

Trotz der vorhin erwähnten bemerkenswerten Anfänge hat die Ermittlung der Invertase durch Messung der Geschwindigkeit der Rohrzuckerverarbeitung praktisch noch keinen rechten Eingang in die Biologie gefunden, und dies ist begreiflich, wenn man das Chaos überblickt, in dem die Theorie der Invertasewirkung während beinahe zwei Jahrzehnten herumgeirrt ist. Glücklicherweise hat sich in jüngster Zeit die Wirrnis gelichtet. Eine ausgezeichnete Arbeit von Hudson¹⁰⁾, deren Resultate von Taylor¹¹⁾ bestätigt worden sind,

²⁰⁾ Jona, Journ. Physiol. 40 (1910) 21.

¹⁾ Vandeveld, Biochem. Zeitschr. 23 (1909) 324.

²⁾ Weinland, Zeitschr. f. Biol. 47 (1906) 279.

³⁾ Mendel u. Kleiner, Amer. Journ. Physiol. 26 (1910) 396.

⁴⁾ Abderhalden u. Kapfberger, Zeitschr. f. physiol. Chem. 69 (1910) 23.

⁵⁾ Abderhalden u. Rathsmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71 (1911) 367.

⁶⁾ Abderhalden, Abwehrfermente des tierischen Organismus, Berlin 1913, S. 66—72.

⁷⁾ Siehe als Gegenstück zu diesen Abwehrfermenten gegenüber Rohrzucker das allerdings sehr wenig kräftige Antiferment, welches Schütze u. Bergell, Zeitschr. f. klin. Med. 61 (1907) 366, durch Invertaseinjektion erhalten haben, wobei jedoch auch eine unspezifische Hemmungswirkung, z. B. infolge einer Kolloidadsorption durch Normalserum oder durch einen Gehalt des Invertasepräparates an Zymoiden, einen spezifischen Immunkörper vorgetäuscht haben könnte; siehe Erikson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 72 (1911) 313.

⁸⁾ Robertson, Edinburgh Med. Journ. 39 (1894) 2; Edmonds, Journ. Physiol. 19 (1895) 466.

⁹⁾ Axenfeld, Zentralbl. f. Physiol. (1903) 268. Ueber das sonstige Vorkommen der Invertase bei Insekten siehe Erlenmeyer, Münchener Akad. Ber. (1874) 205, und Petersen, Pflügers Archiv 145 (1912) 121, deren Arbeiten die Invertase bei den Bienen betreffen [Compt. rend. 149 (1909) 319, sowie Piéron, Soc. Biol. 62 (1907) 772].

¹⁰⁾ Hudson, Journ. Amer. Chem. Soc. 30 (1908) 1160, 1564, 31 (1909) 655.

¹¹⁾ Taylor, Journ. Biol. Chem. 5 (1909) 405.

hat nämlich den Nachweis erbracht, daß die Ergebnisse der grundlegenden Arbeit von O'Sullivan und Thompson¹⁾ durchaus den Tatsachen entsprechen. Danach ist die Rohrzuckerinversion unter dem Einfluß der Invertase eine katalytische Reaktion von monomolekularem Verlauf, und zwischen der pro Zeiteinheit invertierten Zuckermenge und der Enzymkonzentration besteht Proportionalität²⁾.

Um diese Gesetzmäßigkeiten klar zu erkennen und dadurch für die Invertase eine brauchbare Meßmethode zu erhalten, ist es allerdings unbedingt erforderlich, die Birotation der Glukose zu berücksichtigen. Bei der Säureinversion wie bei der Invertaseinversion bildet sich nämlich zunächst eine labile, durch großes Drehungsvermögen ausgezeichnete Modifikation der Glukose und Fruktose, die sich hierauf unter Rückgang der Drehung in die entsprechenden stabilen Formen umlagert. In Gegenwart von Wasserstoff- oder Hydroxylionen³⁾ vollzieht sich diese Umlagerung bei beiden Zuckern außerordentlich rasch, so daß bei der Säureinversion keine Störung durch Multirotation in Frage kommt. Anders ist es bei der Invertaseinversion, bei welcher kein katalysierendes Agens in Form von Wasserstoff- oder Hydroxylionen den Rückgang der Birotation beschleunigt. Hier vermag sich nur der eine Zucker, die Fruktose, so rasch umzulagern, daß seine Multirotation praktisch vernachlässigt werden kann. Die α -Glukose, welche sich ca. 11mal langsamer als die Fruktose in die stabile Modifikation umlagert, bedingt dagegen eine sehr erhebliche Fehlerquelle. Um dieselbe auszuschalten und es damit erst zu ermöglichen, daß die im Polarisationsapparat konstatierte Drehung dem tatsächlichen Fortschritt der Reaktion entspricht, haben O'Sullivan und Thompson jedesmal, bevor sie die polarimetrische Ablesung an den nach bestimmten Zeitintervallen der Untersuchungsflüssigkeit entnommenen Proben ausführten, dieselben mit Alkali versetzt, wodurch ein fast momentaner Rückgang der Birotation der Glukose erzielt wird.

¹⁾ O'Sullivan u. Thompson, Journ. Chem. Soc. 57 (1890) 835.

²⁾ Zur Illustrierung diene eine von O'Sullivan u. Thompson, loc. cit. vorige Fußnote, S. 848 angegebene Tabelle; siehe auch Euler, Allg. Chem. d. Enzyme, Wiesbaden 1910, S. 116; Hudson, loc. cit. Fußnote 10, vorige Seite, hat den Einfluß der Konzentration der Invertase auf die Inversionsgeschwindigkeit durch eine Tabelle wiedergegeben, welche Euler, loc. cit. S. 117, reproduziert hat. Siehe ferner über die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Fermentkonzentration R. O. Herzog u. Kasarnowski, Zeitschr. f. Elektrochem. 13 (1907) 533; Biochem. Zeitschr. 11 (1908) 172.

³⁾ Siehe Mellor u. Bradshaw, Zeitschr. f. physik. Chem. 48 (1904) 353.

Wie groß der Einfluß ist, den die Multirotation der Glukose auf die Versuchsergebnisse ausübt, erhellt aus folgender Tabelle von Hudson.

Minuten	Drehung		$10^5 k = \frac{10^5}{t} \log \frac{a}{a-x}$	
	ohne Alkali	mit Alkali	ohne Alkali	mit Alkali
0	24,50	24,50	—	—
30	16,85	14,27	396	558
60	10,95	7,90	399	530
90	4,75	3,00	464	539
110	1,95	0,80	482	534
130	— 0,55	— 1,49	511	559
150	— 2,20	— 2,40	522	533
∞	— 7,47	— 7,47	—	—

Aus der letzten Kolonne geht hervor, daß die nach der Gleichung für monomolekulare Reaktionen berechneten k -Werte bei den mit Alkali versetzten Proben konstant sind, während sich aus der zweit-letzten Spalte eine starke Zunahme der Geschwindigkeitskonstante k entsprechend dem fehlenden Alkalizusatz ergibt.

Es erscheint fast unbegreiflich, daß eine so ausgeprägte Fehlerquelle, wie sie die allgemein bekannte Erscheinung der Multirotation der Glukose in sich schließt, eine Klippe für das ganze Invertasestudium der folgenden Zeit werden konnte, um so mehr, als schon die ersten Autoren O'Sullivan und Tompson mit Nachdruck gerade auf diesen Punkt von fundamentaler Wichtigkeit hingewiesen haben, und obschon deren bedeutungsvolle Arbeit das Objekt vieler Angriffe gewesen ist, — also doch wohl oft und gründlich gelesen worden sein muß.

Zuerst war es Duclaux¹⁾, der gegen die Ergebnisse der Arbeit der englischen Autoren zu Felde zog. Nach ihm wäre ohne den störenden Einfluß der Reaktionsprodukte der Umsatz als Gerade wiederzugeben. Ihm folgte Henri²⁾, welcher an Stelle der Formel für monomolekulare Reaktionen auf Grund seiner experimentellen Befunde den Ausdruck setzen wollte:

$$2k = \frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}.$$

Unter der Voraussetzung, daß das Ferment vom Substrat verankert werde und daß Verbindung und Spaltung des Ferment-Substrat-

¹⁾ Duclaux, Chim. Biol. (1883); Traité de Microbiologie 2 (1899) 129, 142; Ann. Inst. Pasteur 12 (1898) 96.

²⁾ Henri, Zeitschr. f. physik. Chem. 39 (1902) 194.

Komplexes durch das Massenwirkungsgesetz beherrscht werde, hat Bodenstein¹⁾ versucht, die Henrischen Resultate mit der folgenden Formel²⁾ in Uebereinstimmung zu bringen.

$$k \cdot E = \frac{a+i}{t} \left((m-n) \frac{x}{a+i} + n \cdot \log \frac{a}{a-x} \right).$$

i bedeutet die von vornherein hinzugefügte Quantität Invertzucker, E die Enzymmenge, m und n Konstanten, welche die spezifische Schwächung der Invertase durch Rohrzucker resp. Invertzucker ausdrücken.

Da ihm dies nicht auf der ganzen Linie gelang³⁾, so erweiterte Henri⁴⁾ diese Gleichung unter der Annahme, daß neben dem Rohrzucker auch die Reaktionsprodukte einen Teil des Fermentes binden und daß das Massenwirkungsgesetz auch diese Verbindung beherrscht. Durch Integration der Gleichung

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\text{konst.} \cdot m \cdot E (a-x)}{1+m(a-x)+n \cdot x}$$

erhielt er:

$$k = \frac{a}{t} \left((m-n) \frac{x}{a} + \log \frac{a}{a-x} \right) + \frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x},$$

eine Formel, welche bei geeigneter Wahl der Konstanten seine Resultate wiederzugeben vermochte. Immerhin hat Henri⁵⁾ selbst später seine Theorie verlassen, indem er sich nunmehr vorstellt, daß die Enzymwirkung abhängt erstens von dem Verteilungsgesetz zwischen Kolloid und Lösung, zweitens von der Geschwindigkeit, mit der die Verteilung vor sich geht, drittens von der Reaktionsgeschwindigkeit an und für sich und endlich von dem Einfluß anderer Substanzen, z. B. der Reaktionsprodukte auf die drei genannten Vorgänge. Um dieser seiner neuen Theorie Ausdruck zu geben, hat Henri⁶⁾ die vorläufige Formel aufgestellt:

$$\frac{a-x}{a} = \frac{1}{k_2 - k_1} \left(k_2 - \frac{1}{1+m \cdot a} \right) e^{-k_1 t} \left(k_1 - \frac{1}{1+m \cdot a} \right) e^{-k_2 t}.$$

¹⁾ Bodenstein, zitiert nach Euler, Allg. Chem. d. Enzyme 1910, S. 92; siehe auch Bodenstein, Zeitschr. f. Elektrochem. 15 (1909) 414.

²⁾ Um zum Ausdruck zu bringen, daß Rohrzucker stärker als Invertzucker wirkt, setzte Bodenstein $m = 2$ und $n = 1$.

³⁾ Nur die an mäßig verdünnten Lösungen gemachten Beobachtungen ließen sich durch die Formel darstellen.

⁴⁾ V. Henri, *Théorie générale de l'Action de quelques Diastases*, Compt. rend. 135 (1902) 916; *Lois générales de l'action des diastases*, Thèse, Paris 1903, S. 77 ff.; Zeitschr. f. Elektrochem. 11 (1905) 390.

⁵⁾ Henri, Zeitschr. f. physik. Chem. 51 (1905) 19.

⁶⁾ Henri, Zeitschr. f. Elektrochem. 11 (1905) 790.

Mit der Theorie der Invertasewirkung haben sich auch eine Reihe anderer Forscher eingehend beschäftigt. R. O. Herzog¹⁾ hat unter der Voraussetzung, die Nernstsche Gleichung bei fermentativen Prozessen Gültigkeit besitze, daß die Viskosität des Substrates die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusse, Formel aufgestellt:

$$k = b \sqrt{\frac{1}{Aa + Ba^2}}.$$

in a die Konzentration des Substrates, b einen die Fermentaktivität anzeigenden Faktor, A und B Konstanten und k den Geschwindigkeitskoeffizienten, berechnet nach Henris erster Formel, bedeutet²⁾. A. J. Brown³⁾, welcher annimmt, daß der absolute Umsatz der Substratkonzentration proportional sei, wenn diese sehr gering, die Fermentkonzentration dagegen groß ist, hat, wie Bodenstein und Henri, eine Verbindung zwischen Ferment und Substrat angenommen. Moore⁴⁾ hat eine sehr komplizierte Formel aufgestellt:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 \left(1 \pm k_3 \frac{x}{a} \right) (a - x) - k_2 \left(1 \pm k_3 \frac{a - x}{a} \right) x^2,$$

zum Ausdruck bringen soll, daß die Reaktion reversibel ist (bimolekulare Umkehrreaktion) und daß das Ferment während des Umsatzes Veränderungen seiner Aktivität erleidet. Mit einer Reversibilität der Invertasewirkung rechnet auch Herzog⁵⁾, dessen Formel auf S. 571 des *Allg. Teils* der Katalyse angegeben ist. Herzog⁶⁾ hat gegen diese Auffassung das Fehlen eines sicheren Beweises für die Zuckersynthese geltend gemacht, für welche letztere immerhin Beobachtungen Kohl⁷⁾ sprechen.

Für den großen Aufwand an Denkerarbeit, der zur Aufstellung der genannten und anderer Formeln und Theorien notwendig war, ist es wohl schade, daß die Wiederentdeckung einer unbeachteten Fehlerquelle zu der Erkenntnis zurückgeführt hat, daß die einfache Formel der bimolekularen Reaktionen den Tatsachen im allgemeinen völlig genügt zu werden vermag; aber vom praktischen Standpunkt ist die

¹⁾ R. O. Herzog, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41 (1904) 416, 43 (1904) 222, 1906) 365; Zeitschr. f. allg. Physiol. 4 (1904) 193; Habilitationsschrift 1905; Congr. f. angew. Chem., Rom 1906, 10. Sektion, S. 370.

²⁾ Ueber die interessante Vorstellung, daß die Viskosität hier eine Rolle spielt, siehe auch die späteren Arbeiten von Achalme, Compt. rend. 152 (1911) 1328, 1420, 1621; Achalme u. Bresson, Ebenda 152 (1911) 1328, 1420, 1621.

³⁾ A. J. Brown, Journ. Chem. Soc. London 81 (1902) 373.

⁴⁾ Moore, Recent advances in Physiol. and Biochemistry, London 1906, S. 83; siehe Bayliß, Enzymwirkung, S. 53.

⁵⁾ Visser, Koninkl. Akad. van Wetensch. Amsterdam, Sitzungsber. vom Februar 1904 und Zeitschr. f. physik. Chem. 52 (1905) 257.

⁶⁾ Herzog in Oppenheimer, Fermente, Bd. 2, 1913, 4. Aufl., S. 968.

⁷⁾ Kohl, Beihefte Bot. Zentralbl. 23 (1908) 64; siehe ferner über Reversibilitätsphänomene Pantanelli, Ber. d. bot. Ges. 26 (1908) 494; Beyerinck, Koninkl. Akad. van Wetensch. Amsterdam 18 (1910) 591, 898; Malys Jahrb. (1910) 915 Fol. Mikrobiol. 1 (1912) Heft 4. Ueber die eigenartigen Ansichten von Bodenstein siehe Ebenda, S. 62 u. 63.

dadurch gegebene Vereinfachung sehr zu begrüßen, und man kann nur wünschen, daß auch bei anderen Fermenten, bei denen zur Stunde noch mit derartig komplizierten Formeln gearbeitet wird, die Verhältnisse eine Klärung erfahren werden, die dem Biologen und biologischen Chemiker die Durchdringung dieser für ihn so wichtigen Materie ermöglicht.

Was speziell die Verhältnisse bei der Invertase betrifft, so haben die grundlegenden Arbeiten der letzten Zeit den Weg geebnet für die quantitative Bestimmung der Invertase, wo immer sie in der Natur zu finden ist. Bei der bestehenden Proportionalität zwischen der Inversionsgeschwindigkeit und der Enzymkonzentration könnte es z. B. möglich sein, den Invertasegehalt nach einer Methode zu ermitteln, welche der Hofmannschen Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration im Magensaft¹⁾ analog ist und dementsprechend auf einen Vergleich der invertasehaltigen Untersuchungsflüssigkeit mit einer Invertaselösung von bekanntem Gehalt²⁾ hinauslaufen würde; doch mahnen immerhin die zwischen der Rohrzuckerinversion durch Säuren und derjenigen durch Invertase bestehenden Abweichungen zur Vorsicht³⁾. Unter allen Umständen muß bei der Ausführung einer quantitativen Invertasebestimmung durch die zeitliche Verfolgung der Rohrzuckerinversion im Polarisationsapparat darauf geachtet werden, daß die Flüssigkeit, welche auf ihre Inversionsfähigkeit geprüft werden soll, schwach sauer reagiert, so daß der Invertase möglichst die für ihre Wirkung günstigste Wasserstoffionenkonzentration zur Verfügung steht. Nach Hudson ist schon in einer 0,0006 normalen Salzsäurelösung das Optimum für die Tätigkeit dieses Fermentes erreicht; Kanitz⁴⁾ gibt hierfür die Konzentration $3,3 \cdot 10^{-8}$ bis $3,3 \cdot 10^{-4}$ an, und nach Sørensen⁵⁾ gründlichen Studien beträgt die optimale Wasserstoffionenkonzentration für die Invertase $10^{-4,4}$ bis $10^{-4,6}$ ⁶⁾, wobei allerdings geringe Schwankungen bei Invertasen verschiedener Herkunft vorkommen

¹⁾ Siehe *Spez. Teil*: Katalyse durch Wasserstoffionen, S. 125—128.

²⁾ Wegen des „Alterns“ der kolloiden Lösungen und der großen Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenen Beimengungen müßte selbstverständlich die Testflüssigkeit vor jeder Bestimmung hinsichtlich ihres Wirkungswertes kontrolliert und aus einem Invertinpräparat von immer gleicher Herkunft bereitet werden.

³⁾ Tammann, *Zeitschr. f. physik. Chem.* 3 (1889) 33.

⁴⁾ Kanitz, *Pflügers Archiv* 100 (1903) 547.

⁵⁾ Sørensen, *Biochem. Zeitschr.* 21 (1909) 279, 22 (1909) 352.

⁶⁾ Höhere Wasserstoffionenkonzentrationen verbieten sich natürlich auch, wegen der eigenen Inversionswirkung der Säuren.

dürften¹⁾. Ferner muß beachtet werden, daß die für die polarimetrische Untersuchung von Zeit zu Zeit entnommenen Flüssigkeitsproben vor der Ablesung mit Alkali versetzt werden, um den Rückgang der Multirotation der Glukose zu beschleunigen.

Maltase. Dieses Enzym, dessen große Empfindlichkeit gegenüber den verschiedensten Agenzien²⁾ dazu benutzt werden kann, eine gleichzeitige Maltasewirkung aufzuheben, wenn es sich um die Untersuchung diastaseführender Materialien handelt³⁾, findet sich fast in allen Hefearten⁴⁾, außer denjenigen, die an ein milchzuckerhaltiges Substrat angepaßt sind und dementsprechend Laktase produzieren⁵⁾. Wie der Invertase, so kommt auch der Maltase die Funktion der Disaccharidspaltung zu. Im Gegensatz zu dem ersteren auf Rohrzucker eingestellten Enzym ist die Maltase imstande, die Maltose, welche als Produkt der Wirkung der mit der Maltase vergesellschafteten diastatischen Fermente auftritt, wie auch deren Osazon⁶⁾ und Oson (Emil Fischer), sowie die α -Glukoside weiter zu Traubenzucker

¹⁾ So geben Bertrand u. Rosenblatt, *Compt. rend.* 153 (1912) 1515, 154 (1912) 837, ein höheres H⁺-Ionenoptimum für die *Aspergillus*invertase an.

²⁾ Siehe z. B. Bokorny, *Chem.-Ztg.* 25 (1901) 365, 502; Bau, *Wochenschr. f. Brauerei* 20 (1903) 560, sowie im folgenden Emil Fischer, loc. cit. nachfolgende Fußnoten; siehe auch Derselbe, *Ber. d. chem. Ges.* 28 (1895) 1433; *Ges. Abhandl.* S. 850, und die im folgenden in dieser Fußnote angegebene Literatur. Manche der widersprechenden Angaben über die Wirkung von Giften, z. B. Chloroform auf Maltase [vgl. Lintner u. Kröber, *Ber. d. chem. Ges.* 28 (1895) 1050; Hérissey, *Soc. Biol.* 48 (1896) 915; Kopaczewski, *Biochem. Zeitschr.* 44 (1912) 349] mögen in der ungleich starken Wirkung des geprüften Fermentes begründet sein.

³⁾ So konnte Bial, *Pflügers Archiv* 53 (1893) 156, 54 (1893) 72, die Maltosespaltung durch Blutserum mittels Alkohol aufheben, während die diastatische Wirkung erhalten blieb.

⁴⁾ Nach Emil Fischer u. Lindner, *Ber. d. chem. Ges.* 28 (1895) 984; siehe auch Emil Fischer, *Ges. Abhandl.* S. 860, ist der *Sacharomyces Marxianus* maltasefrei, ebenso *Sacharomyces Ludwigii*, *exiguus* und *apiculatus* [Will, *Zentralbl. f. Bakt.* [2] 34 (1912) 1; Lindner, *Wochenschr. f. Brauerei* (1900) Heft 48 ff.].

⁵⁾ Die Beobachtung von E. Fischer, *Ber. d. chem. Ges.* 27 (1894) 3481, daß sich Maltase und Laktase gegenseitig ersetzen und deshalb nicht zusammen auftreten, haben Bourquelot u. Hérissey, *Compt. rend.* 121 (1895) 693 und *Bull. Soc. Mycol.* 10, 285, S. A., bestätigt. Nur ein Pilz, *Allescheria Gayoni*, verhält sich abweichend, da er nach Laborde, *Ann. Inst. Pasteur* 11 (1897) 1, imstande ist, Maltose und Laktose anzugreifen und daher im Besitze der zugehörigen Fermente sein muß.

⁶⁾ Neuberg u. Saneyoshi, *Biochem. Zeitschr.* 36 (1911) 44.

zu verarbeiten und damit dem Zymaseeinfluß zugänglich zu machen. Diese, die alkoholische Gärung vorbereitende fermentative Tätigkeit der Hefe, die zwischen den Wirkungen der Diastase und der Zymase die Brücke bildet, läßt sich dadurch gesondert verfolgen, daß man die mit alkoholischer Gärung einhergehende vitale Zelltätigkeit der Hefe am besten durch Zusatz von 1 % Toluol lähmt¹⁾.

Außer in den Hefezellen, aus denen sie ähnlich wie die meist mit ihr vergesellschaftete Invertase²⁾ erst nach scharfer Trocknung an Wasser abgegeben wird³⁾, findet sich die Maltase bei vielen anderen Pflanzen und Tieren. Sie ist im Speichel, im Darmsaft, im Pankreassekret, im Blutserum, in Leber und Niere enthalten⁴⁾, und ihre Ermittlung auf Grund der durch sie bewirkten Maltosespaltung ist daher für den Biologen und physiologischen Chemiker von Bedeutung. Vom praktischen Standpunkt ist aber noch wichtiger die Bestimmung der Maltase im Malzextrakt, in welchem sie neben Invertase und Diastase vorkommt.

Die Grundlage hierfür, die quantitative Beschreibung der Maltosespaltung durch Maltase, ist erst in den letzten Jahren wesentlich gefördert worden. Es hat sich dabei herausgestellt, daß die Herkunft des Fermentes in sehr erheblichem Maße die Gesetzmäßigkeiten beeinflusst, denen die Maltasewirkung gehorcht, wobei die Frage offen bleiben möge, ob diese Differenzen, die sich auch in einer ungleichen Spaltungsfähigkeit gegenüber verschiedenen Substraten, so vor allem in dem unterschiedlichen Verhalten gegenüber α -Methylglukosid⁵⁾,

¹⁾ Bourquelot, Journ. de l'Anat. et Physiol. 22 (1886) 162, der die Maltosespaltung auf diesem Wege entdeckte [gleichzeitig mit Cuisinier u. Géduld, siehe Chem. Zentralbl. (1886) 614; Wochenschr. f. Brauerei 8 (1891) 545; siehe auch die Beobachtungen von Musculus u. Gruber, Zeitschr. f. physiol. Chem. 2 (1878/79) 182, sowie von Mering, Ebenda 5 (1881) 185] und mit Hamburger, Pflügers Archiv 60 (1895) 575, einem besonderen Enzym, der sog. „Glukase“ [siehe auch Beyerinck, Zentralbl. f. Bakt. [2] 1 (1895) 221] zugeschrieben hat, verwandte Chloroform.

²⁾ Schizosacharomyces octosporus enthält nach Emil Fischer und Lindner, siehe Fußnote 4, S. 60, nur Maltase und keine Invertase, während Sacharomyces exiguus und Ludwigii umgekehrt nur Invertase und keine Maltase enthalten.

³⁾ Emil Fischer, Ber. d. chem. Ges. 28 (1895) 1433; Ges. Abhandl. S. 850; Hill, Journ. Chem. Soc. London 73 (1898) 634.

⁴⁾ Literatur über das Vorkommen der Maltase siehe Oppenheimer, loc. cit. 4. Aufl., Bd. 1, Leipzig 1913, S. 204—206.

⁵⁾ Lindner, loc. cit.; Kalanthar, loc. cit. bei Invertase. Emil Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 26 (1898) 61; Emil Fischer u. Niebel, Berl. Akad.

sowie in einer ungleichen Empfindlichkeit gegenüber Temperaturerhöhung¹⁾ und gewissen Giften ausprägen, in Differenzen des Maltasemoleküls selbst begründet sind, wie dies Emil Fischer (loc. cit.) annimmt, oder in der Ungleichartigkeit der Begleitstoffe in den verschiedenen schon erwähnten maltasespaltenden Objekten.

Für die Maltase aus Takadiastase (Merck) fand Ch. Philoche²⁾, daß die Geschwindigkeit des Umsatzes der Fermentmenge proportional ist³⁾. Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Substratkonzentration ergibt sich aus der Gleichung⁴⁾:

$$2k = \frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}.$$

Die Maltasewirkung fügt sich also nicht dem Zeitgesetz der monomolekularen Reaktionen, und abgesehen von einigen wenigen Versuchen von Taylor (loc. cit.), die auch hier für die Gültigkeit der monomolekularen Reaktionsgleichung sprechen, besteht vorläufig auch keine Aussicht, durch Aenderung der Arbeitsbedingungen wie bei der Invertase die Gültigkeit der einfachen monomolekularen Formel darzutun, denn die bei 39—40° in Gegenwart von Fluornatrium als Desinfektionsmittel angestellten Versuche Ch. Philoches sind durch die Multirotation der Glukose nicht beeinflusst, da vor der Polarisierung⁵⁾ ein Tropfen Sodalösung zu der zu untersuchenden Probe gesetzt wurde. Auch wurde erst längere Zeit nach diesem Zusatz abgelesen.

Ber. 1. Halbband (1896) 73; Bierry, Compt. rend. 149 (1909) 314; Dox u. Neidig, Biochem. Zeitschr. 46 (1912) 397.

¹⁾ Emil Fischer, loc. cit. vorige Fußnote; Huerra, Thèse de la fac. des Sciences de Paris (1910); Compt. rend. 148 (1909) 300.

²⁾ Ch. Philoche, Journ. Chim. Physique 6 (1908) 213, 355; Compt. rend. Soc. Biol. 57 (1904) 171; V. Henri u. Terroine, Archivio di Fisiologia 2 (1904) I; zitiert nach Euler, Allg. Chem. d. Enzyme 1910, S. 119; V. Henri, Compt. rend. Soc. Biol. 56 (1904) 494, 1003, 57 (1904) 171.

³⁾ Verhielten sich die Fermentmengen wie 1:2, so wurden dementsprechend z. B. im ersten Fall 40% in 48 Stunden, im zweiten Fall 41% in 24 Stunden umgesetzt; war das Verhältnis 1:5, so wurden im ersten Falle 54% in 28 Stunden umgesetzt, während im zweiten nur 6 Stunden für den nämlichen Umsatz erforderlich waren.

⁴⁾ Eine andere Formel:

$$k' = \frac{a}{t} \left(\frac{2x}{a} + \log \frac{a}{a-x} \right),$$

gibt ebenfalls konstante Werte für k'.

⁵⁾ Selbstverständlich kann die Bestimmung auch durch Reduktion einer alkalischen Kupfersulfatlösung erfolgen. Empfindlicher ist jedoch die polarimetrische Methode.

Ganz andere Resultate werden erhalten, wenn Hefemaltase zur Anwendung gelangt. Nach R. O. Herzog, C. Th. Becker und Kasarnowski¹⁾ wird die Beziehung zwischen der Geschwindigkeit der Maltosespaltung und der Fermentmenge durch die Formel

$$\frac{V}{\sqrt{F}} = k$$

ausgedrückt. Die Geschwindigkeit V ist also der Quadratwurzel aus der Fermentmenge F proportional. Die Glukose als Spaltungsprodukt, sowie auch Fruktose und Milchzucker verzögern nach denselben Autoren den Einfluß des Fermentes²⁾, während Armstrong³⁾ nur für die Galaktose, nicht aber für Lävulose und Dextrose eine Verzögerung wahrgenommen hat, und V. Henri und Philoche⁴⁾ wiederum finden bei Glukose eine sehr schwache, bei Fruktose eine stärkere Verzögerung.

Schon im *Allgemeinen Teil* wurde auf die Bedeutung der Hemmungswirkung durch Spaltprodukte hingewiesen und gezeigt, daß bei der Maltase zum ersten Male der in theoretischer und praktischer Hinsicht gleich wichtige Beweis der Umkehrbarkeit der Enzymwirkungen durch Croft Hill geliefert worden ist. Das Reversionsprodukt ist zwar aller Wahrscheinlichkeit nach nicht Maltose selbst, sondern ein Isomeres derselben, über dessen Natur die Untersuchung noch nicht als völlig abgeschlossen betrachtet werden kann. Nach Emmerling⁵⁾ wäre das Reversionsprodukt — ein von Croft Hill⁶⁾ als Revertose bezeichnetes Disacharid — identisch mit der von Emil Fischer⁷⁾ synthetisierten Isomaltose⁸⁾, während es nach anderen Angaben davon verschieden wäre. Hill (loc. cit.) nimmt die Bildung von echter Maltose neben Revertose an, und auch Doxiades⁹⁾ will bei der Einwirkung von Blutserum auf Glukose Maltose erhalten

¹⁾ R. O. Herzog, C. Th. Becker u. Kasarnowski, 6. Congr. intern. di chim. appl., Rom 1906, 10. Sekt., S. 370.

²⁾ Waren bei 10 ccm einer 10 %igen wäßrigen Maltoselösung ohne Zusatz 36 % hydrolysiert, so waren bei gleichzeitiger Anwesenheit der nachfolgend genannten Zucker in 30 %iger Lösung (im selben Wasserquantum gelöst) die folgenden Maltosemengen hydrolysiert: bei Glukose 9,7 %, bei Fruktose 17,9 %, bei Maltose 16,7 %, bei Laktose 35 %.

³⁾ Armstrong, Proc. Roy. Soc. London **73** (1904) 500, 516, 526.

⁴⁾ V. Henri u. Philoche, Soc. Biol. **56** (1904) 1005, **57** (1904) 170.

⁵⁾ Emmerling, Ber. d. chem. Ges. **34** (1901) 600, 3810; Armstrong, Proc. Royal Soc. London [Serie B] **76** (1905) 592, u. Bayliss, Nature of enzyme action, London 1908, S. 31.

⁶⁾ Croft Hill, Transact. Chem. Soc. **83** (1903) 578.

⁷⁾ Emil Fischer, Ber. d. chem. Ges. **23** (1890) 3687, **28** (1895) 3024; Ges. Abhandl. S. 668; Zeitschr. f. physiol. Chem. **26** (1898) 71.

⁸⁾ Eine Isomaltose als fermentatives Stärkespaltungsprodukt stellte Lintner, Zeitschr. f. ges. Brauwesen (1891) 281, (1892) 6, 123, (1894) 414, dar.

⁹⁾ Doxiades, Biochem. Zeitschr. **38** (1912) 306.

haben¹⁾. Eine Klärung der ganzen Frage ist wohl kaum zu erwarten, solange noch entgegen der von Emil Fischer selbst vertretenen Auffassung die Isomaltose einerseits in ihrer Einheitlichkeit angezweifelt²⁾, anderseits nur als eine unreine Maltose betrachtet wird³⁾.

Prinzipiell ist es jedoch von nebensächlicher Bedeutung, welcher Art das resynthetisierte Disacharid ist. Infolge der als Birotation bekannten und schon im vorigen in anderem Zusammenhang erwähnten Erscheinung der Umlagerung der Hexosen in stereoisomere Formen steht dem resynthetisierenden Enzym durchaus nicht immer die Hexosemodifikation zur Verfügung, die es bei einer vorausgegangenen Spaltung eines Disacharids erzeugte, und das aus einer isomeren Hexoseform erhaltene Reversionsprodukt kann sich daher von der ursprünglichen Biose unterscheiden. Es ist das Verdienst von Armstrong (loc. cit.), darauf hingewiesen zu haben, daß sich die α -Glukose, welche sich bei der Spaltung des α -Glukosids Maltose zunächst bildet, in β -Glukose umlagert, und daß diese es ist, die der Reversion anheimfällt. Die Veränderungen, welche sich bei der Umlagerung der α -Form in die β -Form am Hexosemolekül vollziehen, sind wohl im allgemeinen so geringfügig, daß sich die umgelagerte Form wie das direkte Spaltprodukt verhält und dementsprechend der Resynthese nach dem Massenwirkungsgesetz ebenso wie dieses letztere unterliegt. Nach dieser hier vertretenen Auffassung, wonach der Spaltproduktcharakter gleichsam an den Kern des betreffenden Hexosemoleküls gebunden wäre, der auch die besonderen chemischen Merkmale bestimmt, durch die sich der Zucker, wie in diesem Fall die Glukose, von anderen Zuckern unterscheidet (während die feinen stereochemischen Differenzen zwischen α - und β -Form in dieser Hinsicht einflußlos sind), würde die Annahme als überflüssig erscheinen, daß hier besondere resynthetisierende Enzyme am Werke wären, die als Glukesen bezeichnet werden könnten, entsprechend der Nomenklatur von Euler, der an den Stamm des zu einem komplizierteren Molekül zu kondensierenden Produktes die Endsilbe „ese“ anhängt. Die von Bayliss (loc. cit.) scharf bestrittene Angabe Armstrongs, daß das Produkt der fermentativen Synthese, z. B. Isomaltose, durch dasselbe Ferment, z. B. Maltase, nicht wieder gespalten werden kann, braucht ebenfalls nicht in Widerspruch zu dem Prinzip der Reversibilität der Fermentwirkungen zu stehen; denn es wäre denkbar, daß bei der Koppelung umgelagerter Spaltprodukte zu einem mit dem Ausgangsmaterial isomeren Disacharid gerade die Stellen des Biosemoleküls eine Modifikation erfahren, welche die (der Spaltung vorausgehende) intermediäre Bindung des Enzyms vermitteln.

¹⁾ Siehe auch die Angabe von Levene u. G. M. Mayer, Journ. Biol. Chem. 9 (1911) 97, die bei der Einwirkung eines Gemisches von Muskel- und Pankreasextrakt auf Glukose ein Disacharid erhielten, das sich durch Maltose hydrolysierendes Extrakt spalten ließ.

²⁾ Vgl. H. Dierssen, Zeitschr. f. angew. Chem. 16 (1903) 121.

³⁾ Brown u. Morris, Journ. Chem. Soc. London 67 (1895) 709; Plimmer, Chemical prod. result. by ferment, London 1903, Kap. 1; Ling u. Baker, Trans. Chem. Soc. 67, 702, 739, 71 (1897) 508; Ost, Chem.-Ztg. (1895) Nr. 67; vgl. ferner die Angaben bei Mohr, Wochenschr. f. Brauerei. (1908) Nr. 41.

Die widersprechenden Literaturangaben lassen keinen bestimmten Schluß darüber zu, ob außer der hemmenden Wirkung durch das Spaltprodukt noch spezifische Bindungen an die als Verzögerer beschriebenen Zucker in Betracht zu ziehen sind. So weit es sich um eine verzögernde Wirkung der Fruktose handelt, brauchen solche spezifische Bindungen nicht notwendigerweise angenommen zu werden, da die nach den Untersuchungen von Lobry de Bruyn und van Ekenstein (loc. cit. *Allgemeiner Teil*, S. 104 u. 205) stattfindende wechselseitige Umlagerung von Fruktose und Glukose ineinander zur Erklärung herangezogen werden könnte. Eine verzögernde Wirkung der Fruktose würde sich danach richten, ob die Bedingungen für die Umlagerung von Fruktose in die als Spaltprodukt der Maltose fungierende Glukose erfüllt wären oder nicht. Doch ist eine solche Erklärungsmöglichkeit noch kein Grund dagegen, daß auch Bindungen die Ursache von Verzögerungen sein können. Für die Maltose selbst, der ja auch starke verzögernde Wirkungen zugeschrieben werden, sind solche sogar wahrscheinlich, da man ja allgemein als Voraussetzung einer fermentativen Spaltung die Verankerung des Fermentes an sein spezifisches Substrat betrachtet, und die Uebereinanderlagerung zweier entgegengesetzter Effekte dieser Bindung wäre vielleicht die Ursache dafür, daß die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Substratkonzentration noch durch keine bestimmte Formel dargestellt werden konnte. Versuche von Lintner und Kröber¹⁾ haben das von Armstrong (loc. cit.) und Herzog²⁾ bestätigte Resultat ergeben, daß die Konstante der monomolekularen Reaktion stark abfällt³⁾, und Herzog, Becker und Kasarnowski fanden im Verlauf ihrer Untersuchung über die Maltosespaltung, bei welcher sie eine Störung durch Multirotation ausschlossen⁴⁾, daß bei ca. 25 % Maltose der relative Umsatz zu Anfang geringer ist als bei höheren oder niederen Maltosekonzentrationen. Die Verhältnisse dürften demnach hier besonders verwickelt sein, und dieser Umstand in Verbindung mit dem völlig ungleichartigen Verhalten der Maltasen verschiedener Herkunft und dem nur unzureichend studierten Einfluß von Säuren und anderen

¹⁾ Lintner u. Kröber, Ber. d. chem. Ges. 28 (1895) 1050.

²⁾ Herzog, Chem. Geschehen im Organismus, Habilitationsschrift, Karlsruhe 1905; Zeitschr. f. Allg. Physiol. 4 (1904) 177.

³⁾ Die Hefemaltase verhält sich nach dieser Richtung gerade entgegengesetzt wie die Maltase aus Takadiastase.

⁴⁾ Indem sie die Lösung erst nach erfolgtem Zusatz von Natronlauge und Aluminiumsulfat und nach längerem Stehen polarisierten.

Stoffen auf die Fermentaktivität ¹⁾ läßt die quantitative Messung der Maltasen, wo immer sich dieselben in der Natur finden, vorläufig noch als ein ziemlich schwer zugängliches Problem erscheinen ²⁾.

Quantitative Bestimmungsmethoden der Maltasewirkung müssen daher selbst dort, wo sie nur zu Vergleichszwecken herangezogen werden, vor allem dem Einwand begegnen, daß man ohne eingehendste Spezialuntersuchungen nicht wissen kann, ob die in den zu prüfenden Materialien sich findende Maltase den Fermentmengen selbst oder ihrer Quadratwurzel proportional zu spalten vermag. Wenn daher Kusumoto ³⁾, der eine quantitative Bestimmungsmethode der Maltasewirkung für pflanzliche und tierische Säfte angegeben hat, findet, daß beim Kamel die Leber maltasereicher ist als das Serum, während beim Hund und beim Schwein das Verhältnis das umgekehrte ist, muß man die Frage aufwerfen, ob dieser Befund nicht dadurch veranlaßt sein könnte, daß ähnlich wie beim Parachymosin des Kälbermagens im Vergleich zum Chymosin anderer Tierarten auch bei den Maltasen ein Einfluß der Tierart auf das Fermentgesetz bestünde. Immerhin möge die Methode von Kusumoto als ein Versuch des Praktikers, auf biologischem Gebiete der langsam sich entwickelnden Theorie vorauszuweichen, im folgenden Erwähnung finden.

Nach diesem Verfahren werden eine Anzahl Kölbchen mit je 5 ccm einer 10%igen heiß hergestellten Maltaselösung, 5 ccm Serum, bzw. Organextrakt ⁴⁾ und 5 ccm Toluol beschickt, in einen Thermostaten von 30° eingestellt und das Drehungsvermögen nach vorausgegangenem Enteiweißen ⁵⁾ bei 1—2 Proben sofort nach Herstellung

¹⁾ Kopaczewski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 80 (1912) 182, hat als optimale Salzsäurekonzentration $\frac{1}{160}$ normal angegeben, ein Wert, der infolge der nicht berücksichtigten säurebindenden Begleitstoffe im Reaktionsgemisch zu hoch gegriffen sein dürfte; auch auf die Bedeutung der Säureamine hat dieser Forscher hingewiesen. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration scheint ferner von der Temperatur abzuhängen, da Doxiades, Biochem. Zeitschr. 32 (1911) 410, namentlich bei 50° eine aktivierende Wirkung geringer Säurekonzentrationen bei der Blutmaltase feststellen konnte.

²⁾ Ueber die sonstige analytische Anwendbarkeit der Maltasewirkung siehe unter Emulsin.

³⁾ Kusumoto, Biochem. Zeitschr. 14 (1908) 217.

⁴⁾ Bei Organextrakten müssen wegen der Eigendrehung Kontrollen ohne Maltose angestellt und die gefundenen Werte für das Drehungsvermögen des Extraktes allein von den entsprechenden Werten, die bei den maltosehaltigen Proben gefunden wurden, in Abzug gebracht werden.

⁵⁾ Nach der Vorschrift von Abeles, Zeitschr. f. physiol. Chem. 15 (1891) 495, welche Kusumoto anwendet, wird das Reaktionsgemisch mit 25 ccm einer

des Reaktionsgemisches und bei den übrigen Proben nach gewissen Zeitabständen bestimmt. Zum rascheren Vergleich werden die erhaltenen Resultate graphisch wiedergegeben, wobei man die Zeiten (in Stunden) als Abszissen, die abgelesenen Drehungswinkel als Ordinaten einträgt. Da die Maltose als spezifisches Drehungsvermögen $+138^{\circ} 3'$, die Glukose dagegen nur $+53^{\circ} 17'$ besitzt, so wird unter der Voraussetzung, daß die in den zur Untersuchung gelangenden Proben enthaltenen Maltasen dem selben Fermentgesetz unterstehen, diejenige Probe unter sonst gleichen Bedingungen am maltasereichsten sein, bei der die der Drehungsabnahme entsprechende Kurve am steilsten zur x-Achse des Koordinatensystems abfällt. In qualitativer Hinsicht läßt sich das polarimetrische Verfahren noch dadurch verschärfen, daß man statt der direkten polarimetrischen Ermittlung der Zucker die Osazone des Reaktionsgemisches im Polarisationsapparat untersucht, da das Glukosazon nach links, das Maltosazon dagegen nach rechts dreht¹⁾. Man verfährt bei Anwendung dieser Methode in der Weise, daß man zunächst das mit wenigen Tropfen Essigsäure und einigen Kochsalzkriställchen versetzte Spaltungsgemisch durch Erhitzen enteiweißt, filtriert und das Filtrat mit soviel einer Mischung von zwei Teilen salzsaurem Phenylhydrazin und drei Teilen Natriumacetat (wasserhaltig) versetzt, daß drei Moleküle Phenylhydrazin auf ein Molekül Maltose kommen, worauf man die Probe nach Abfiltrieren der sich anfangs ausscheidenden, die Kristallisation störenden Schmierer 1–1½ Stunden im siedenden Wasserbad sich selbst überläßt. Von der getrockneten Kristallmasse, die als Ganzes oder fraktionsweise²⁾ in Untersuchung genommen werden kann, löst man 0,2 g in einem Gemisch von 4 ccm reinem Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol und polarisiert die Lösung im 100 mm-Rohr. Hat keine Spaltung stattgefunden, so erhält man den dieser Maltosazonmenge entsprechenden Drehungswinkel von $+1^{\circ} 30'$, ist dagegen die Spaltung vollständig, so wird der 0,2 g entsprechende Drehungswinkel von $-1^{\circ} 30'$ erhalten, und bei partieller Hydrolyse kann deren Grad danach beurteilt werden, ob der

5%igen, warm hergestellten Lösung von Zinkacetat in 96%igem Alkohol versetzt, mit Alkohol auf 50 ccm aufgefüllt, umgeschüttelt, filtriert (trockenes Filter) und im 200-mm-Rohr polarisiert.

¹⁾ Neuberg, Ber. d. chem. Ges. 32 (1899) 3384; Derselbe, Der Harn, Berlin 1911, S. 359.

²⁾ Das schwerer lösliche Glukosazon kristallisiert meist schon in der heißen Lösung aus, das leicht lösliche Maltosazon dagegen erst beim Abkühlen, so daß eine Trennung durch fraktionierte Kristallisation bisweilen möglich ist.

Drehungswinkel des Reaktionsgemisches sich mehr dem $+$ -Maltosazon- oder mehr dem $-$ -Glukosazonwert nähert.

An Stelle der polarimetrischen Ermittlung kann auch die Ermittlung nach dem Reduktionsverfahren treten. Qualitativ erfolgt dieselbe am einfachsten mittels des Barfoedschen Reagenses¹⁾, das nur durch Glukose, nicht aber durch Maltose angegriffen wird. Kann also eine Reduktion des Reagenses beobachtet werden, so ist damit der Beweis für die stattgefundene Spaltung und damit für den Maltasegehalt der betreffenden Lösung erbracht. Die Anwendung der Reduktionsmethode zur quantitativen Maltasebestimmung unterliegt denselben prinzipiellen Bedenken, wie die polarimetrische. Eine solche Bestimmung beruht auf der Zunahme des Reduktionsvermögens des Reaktionsgemisches mit fortschreitender Spaltung der Maltose zu Glukose und wird meist mit Fehlingscher Lösung ausgeführt, von der 1 ccm durch 0,00778 g Maltose reduziert wird, während dieselbe Menge des Reagenses 0,005 g Glukose zur Reduktion benötigt.

Zur Maltosebestimmung im Blut usw. werden 50 ccm 5%ige Maltoselösung mit 20 ccm des Untersuchungsmaterials versetzt, 10 ccm davon sofort entnommen, enteiweißt²⁾ eingeeengt, auf ein bestimmtes Volumen gebracht und nach einem der bekannten Verfahren, z. B. nach Fehling-Soxhlet bestimmt³⁾. Der übrig bleibende Anteil wird in einen Thermostaten von 37° gestellt, und in gewissen Zeitintervallen je weitere 10 ccm daraus entnommen und wie die erste Probe weiter behandelt.

Trehalase. Mit Rücksicht darauf, daß die durch dieses Enzym angegriffene Biose, die in einigen wenigen Pilzen, z. B. *Lactarius piperatus* vorkommt, analog der Maltose in zwei Moleküle Glukose zerfällt, möge die Trehalase an dieser Stelle Erwähnung finden. Auch ist es nicht ausgeschlossen, daß die Trehalase nur eine modifizierte Maltase darstellt, obschon gegen diese Annahme außer der etwas größeren Temperatur- und Säureempfindlichkeit der Trehalase vor

¹⁾ 1%ige Kupferazetatlösung und wenig Essigsäure (vgl. *Spez. Teil*, 1. Abteilung im Kapitel Katalyse durch Hydroxylionen).

²⁾ Siehe z. B. Schenk, *Pflügers Archiv* 55 (1893) 203; Rona u. Michaelis, *Biochem. Zeitschr.* 7 (1903) 329; Oppler u. Rona, *Ebenda* 13 (1908) 122.

³⁾ Siehe die 1. Abteilung des *Spez. Teils* im Kapitel Katalyse durch Hydroxylionen.

allem der Umstand spricht, daß die Trehalose durch die Maltase des Blutserums keine Spaltung erfährt¹⁾.

*Laktase*²⁾. Nicht minder verbreitet als die Maltase ist das milchzuckerspaltende Enzym, die Laktase. Gleich der Maltase und an ihrer Statt ist ihr Vorkommen bei vielen Kryptogamen und Phanerogamen sowie im Tierreich festgestellt worden. Von laktasehaltigen oder, vorsichtiger gefaßt, laktosehydrolysierenden Kryptogamen sind zu nennen die Milchzuckerhefen³⁾ und verschiedene Schimmelpilze (wie *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* und *Mucor Cambodja*, *allescheria Gayoni*), sowie wahrscheinlich viele Bakterien⁴⁾. Von Phanerogamen, bei denen die Laktase vorwiegend in den Samen⁵⁾ auftritt, sind nach Brachin⁶⁾ anzuführen: *Cerasus Lusitanica*, *Prunus spinosa*, *Cydonia vulgaris*, *Citrus aurantium*, *Aemilanchier vulgaris*, *Crataegus oxyacantha*, *Sorbus latifolia*, *Cochlearia armoracea*, *Sinapis alba* und *niger*.

Wahrscheinlich findet sich Laktase auch im Mandelextrakt⁷⁾. Doch unterscheidet sich dieselbe von der Kefirlaktase durch ihr abweichendes Verhalten gegenüber synthetischen Galaktosiden und dadurch, daß sie nach Armstrong und Horton⁸⁾ nur durch Glukose gehemmt wird, während die Kefirlaktase umgekehrt nur Galaktose als „spezifisches“ und als solches hemmendes Spaltprodukt besitzen soll. Doch könnten für den letztgenannten Unterschied auch Aenderungen der Umlagerungsverhältnisse der Spaltprodukte in den ungleichartigen Medien in Frage kommen, da nach dem Massenwirkungsgesetz in beiden Fällen beide Spaltprodukte hemmen müßten, vorausgesetzt, daß sie keine Aenderung durch Begleitstoffe erleiden, die ihrem Spaltproduktcharakter Abbruch tun⁹⁾.

¹⁾ Bourquelot u. Gley, Compt. rend. Soc. Biol. 47 (1895) 515.

²⁾ Literatur über Laktase siehe auch Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, Bd. I, Leipzig 1913, S. 222/226.

³⁾ Heinze u. Cohn, Zeitschr. f. Hygiene 46 (1904) 286; Mazé. Ann. Inst. Pasteur 17 (1903) 11.

⁴⁾ Nageli, Die niederen Pilze, 1882, S. 12.

⁵⁾ Nur in *Aucuba japonica* sind die Blätter laktasehaltig.

⁶⁾ Brachin, Journ. Pharm. Chim. 20 (1904) 195, 300.

⁷⁾ Bourquelot u. Hérissé, Soc. Biol. 55 (1903) 219.

⁸⁾ Armstrong u. Horton, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 80 (1908) 321.

⁹⁾ Daß eine Umlagerung stattfindet, geht daraus hervor, daß Emil Fischer u. Armstrong, Ber. d. chem. Ges. 35 (1902) 3144, durch Einwirkung von Lak-

Im Tierreich wurde eine zum Unterschied von Mandellaktase und Darmlaktase auch die Laktobionsäure und deren Osazon spaltende¹⁾ Laktase²⁾ im Magendarmsaft von Schnecken (*Helix pomatica*)³⁾ sowie bei Insekten⁴⁾ aufgefunden. Ueber ihr Vorkommen bei den höheren Tieren scheint das letzte Wort noch nicht gesprochen zu sein⁵⁾. Jedenfalls ist sie im Darm junger Säuger enthalten⁶⁾, nach Stephenson⁷⁾ in der durch Glukose, nicht aber durch Galaktose hemmbaren Form. Ob und unter welchen Umständen sie auch im späteren Alter auftritt, ist noch nicht ganz geklärt. Weinland⁸⁾, Bainbridge⁹⁾, Martinelli¹⁰⁾ und Foà¹¹⁾ wollen beim Hund durch Milchdiät Laktase erzeugt haben, und Foà betrachtet als Bedingung für diese im Einklang mit den Beobachtungen über das Auftreten von Abwehrfermenten (Abderhalden) stehende Anpassungserscheinung den unmittelbaren Kontakt der Darmschleimhaut mit Galaktose. Bierry¹²⁾, Plimmer¹³⁾ und Wohlgemuth¹⁴⁾ bestreiten allerdings diese Angaben, welche zu der bei *Aspergillus* von Potte-

tase auf eine konzentrierte Lösung von Glukose und Galaktose, nicht Laktose selbst, sondern die isomere Isolaktose erhalten haben.

¹⁾ Bierry, *Compt. rend.* **148** (1909) 949; Bierry u. Ranc. *Soc. Biol.* **66** (1909) 522; *Compt. rend.* **150** (1910) 1366.

²⁾ Ueber ein Milchzucker in abweichender Weise spaltendes Enzym siehe van de Velde, *Biochem. Zeitschr.* **11** (1903) 61.

³⁾ Bierry u. Giaja, *Soc. Biol.* **60** (1906) 1038, **61** (1906) 485; Bierry u. Scheffer, *Ebenda* **62** (1907) 723.

⁴⁾ Straus, *Zeitschr. f. Biol.* **52** (1909) 95.

⁵⁾ Literatur hierüber bei Oppenheimer, Bd. 1, 4. Aufl., Leipzig 1913. S. 225.

⁶⁾ Aus deren Dünndarmschleimhaut werden hauptsächlich tierische Laktasepräparate gewonnen durch Alkoholfällung (96%ig) des nach dem Reinigen, Abschaben und Zerreiben mit Glassplittern mittels physiologischer Kochsalzlösung (fünffache Menge) gewonnenen Extraktes. Der abfiltrierte Niederschlag wird mit Aether nachgewaschen und im Vakuumexsikkator (über Chlorkalzium) getrocknet. Noch einfacher gestaltet sich die Darstellung pflanzlicher Laktase durch Zerreiben von Kefirkörnern mit Wasser, das man dann $\frac{1}{2}$ —1 Stunde auf die zerriebene Masse bei Zimmertemperatur einwirken läßt, worauf man das wirksame Extrakt abfiltriert.

⁷⁾ Stephenson, *Biochem. Journ.* **5** (1912) 250.

⁸⁾ Weinland, *Zeitschr. f. Biol.* **38** (1899) 607.

⁹⁾ Bainbridge, *Journ. Physiol.* **31** (1904) 98.

¹⁰⁾ Martinelli, *Chem. Physiol. d. Stoffwechsels* [N. F. II] **8** (1907) 431.

¹¹⁾ Foà, *Arch. di Fisiol.* **8** (1910) 121.

¹²⁾ Bierry, *Compt. rend. Soc. Biol.* **58** (1904) 701.

¹³⁾ Plimmer, *Journ. Physiol.* **35** (1906) 20.

¹⁴⁾ Wohlgemuth. *Charité-Ann.* **32** (1908) 306.

vin¹⁾ beobachteten Laktasebildung auf milchzuckerhaltigen Nährböden das Gegenstück bilden. Nach Plimmer sollen die Verhältnisse vielmehr so liegen, daß alle Karnivoren und Omnivoren Laktasebildner sind, während die Herbivoren²⁾ nur in der Jugend Laktase produzieren.

Der Nachweis der Laktase in irgendeinem konkreten Fall auf Grund der stattgefundenen Milchzuckerspaltung ist nicht schwer zu führen, so durch die Darstellung und mikroskopische Identifizierung des Glukosazons (Smp. 204°), nach welcher Methode Emil Fischer³⁾ zuerst die Existenz der Laktase bewiesen hat, und des Galaktosazons (Smp. 194°) oder durch die Oxydation der gebildeten Galaktose zu Schleimsäure (Smp. 213°)⁴⁾.

Die Osazonprobe, die man, wie es bei der Maltose angegeben worden ist, ausführt, kann auch hier durch die polarimetrische Prüfung der erhaltenen Osazone ergänzt werden, gestützt auf den Befund von Neuberg (loc. cit. bei Maltase), daß 0,2 g Galaktosazon gelöst in 10 ccm des erwähnten Pyridinalkoholgemisches bei der Polarisation im 100 mm-Rohr einen Drehungswinkel von $+0^{\circ} 48'$ liefert, Glukosazon, wie schon erwähnt, einen solchen von $-1^{\circ} 30'$, während das unveränderte Laktosazon optisch inaktiv ist.

Auch durch direkte Polarisation der zu prüfenden zuckerhaltigen Lösungen unmittelbar nach dem Laktasezusatz und nach längerem Verweilen im Thermostaten läßt sich eine stattfindende Milchzuckerspaltung feststellen und in ihrem Verlauf verfolgen, da durch die stärkere Rechtsdrehung der Galaktose⁵⁾ ($+83,88^{\circ}$) gegenüber der unveränderten Laktose ($+52^{\circ}$) das Reaktionsgemisch eine fortwährende Drehungszunahme bei der Spaltung des Milchzuckers erfährt. Ferner wird die Tatsache für den Laktasenachweis benutzt, daß Barfoed-sches Reagens durch Milchzucker überhaupt nicht angegriffen wird, während beide Spaltprodukte zu starker Reduktion dieses Reagens befähigt sind.

¹⁾ Pottevin, Ann. Inst. Pasteur 17 (1903) 31.

²⁾ Mit Ausnahme des Kaninchens.

³⁾ Emil Fischer, Ber. d. chem. Ges. 27 (1894) 3479; Ges. Abhandl. S. 845.

⁴⁾ Bei der Oxydation mit Salpetersäure werden z. B. über 75% der Galaktose in Schleimsäure übergeführt. Da jedoch auch Milchzucker selbst bei der Oxydation Schleimsäure zu liefern vermag, was 1780 ihre Entdeckung durch Scheele veranlaßte, so ist wohl der Nachweis der Galaktose nach der Osazonmethode vorzuziehen.

⁵⁾ Glukose besitzt dagegen fast denselben Drehungswinkel ($+52,8^{\circ}$) wie die Laktose.

Während sich die genannten Methoden prinzipiell nicht von den bei der Maltase besprochenen unterscheiden, kommt für den Laktasenachweis noch der Unterschied zwischen Disaccharid und Spaltprodukten gegenüber bestimmten Mikroorganismen in Betracht. Schon im vorigen wurde die von Beyerinck ¹⁾ eingeführte auxanographische Methode genannt, der das von ihm als Laktase benannte Ferment dadurch in Milchwasserhefe feststellen konnte, daß er Bakterien, die auf das ihnen zusagende Substrat Glukose mit Lichtentwicklung reagieren, auf Milchwassernährböden aussäte, die mit der betreffenden Hefekultur geimpft worden waren.

Einfacher und zuverlässiger als die Feststellung einer Aenderung im Zustand eines dem Praktiker noch dazu nicht so leicht zugänglichen Mikroorganismus, der in seiner Reaktionsfähigkeit auch gelegentlich aus verschiedenen schwer zu kontrollierenden Nebenumständen versagen kann ²⁾, ist der Nachweis einer Aenderung im Zustand der gebildeten Glukose unter dem Einfluß von Mikroorganismen. Im vorletzten Kapitel sind die verschiedenen Nachweismethoden, die auf diesem Prinzip basieren, eingehend erörtert. Hier sei nur die einfachste Ausführung der Gärprobe, die auf der volumetrischen Feststellung der gebildeten Kohlensäure nach Zusatz eines erbs- bis haselnußgroßen Stückes Preßhefe im Gärungsöhrchen beruht, genannt. Hat keine Spaltung des Milchwassers stattgefunden, so bleibt die Gärung und damit natürlich die Kohlensäureentwicklung aus. An Hand irgend einer der genannten Proben läßt sich auch durch Feststellung des Ausbleibens oder des schwächeren Ausfalls der betreffenden Reaktion die Gegenwart von Hemmungskörpern — wie z. B. der von Schütze ³⁾ durch Immunisieren von Kaninchen mit Laktase erhaltenen Antilaktase — nachweisen.

Schwieriger gestaltet sich die quantitative Verfolgung der Laktasewirkung durch Analyse des komplizierten Gemisches von Milchwasser, Traubenzucker und Galaktose. Von Brachin (loc. cit.) und Porcher ⁴⁾ sind Methoden zur Berechnung aus der Aenderung des polarimetrischen Verhaltens vor und nach der Milchwasserspaltung angegeben worden. Ferner hat Porcher (loc. cit.) eine quantitative

¹⁾ Beyerinck, Zentralbl. f. Bakt. 6 (1889) 44 und loc. cit.

²⁾ Negative Befunde dürfen daher nicht als Beweis gegen das Vorhandensein einer Laktase herangezogen werden.

³⁾ Schütze, Zeitschr. f. Hygiene 48 (1904) 457.

⁴⁾ Porcher, Bull. Soc. Chim. [3] 33 (1905) 1285.

Bestimmungsmethode ausgearbeitet, die auf dem ungleichen Reduktionsvermögen der unveränderten Laktoselösung und des Spaltungsgemisches beruht. Dieser Forscher löst je 5 g Milchzucker in 80 ccm Wasser, fügt zu einer Probe die zu prüfende Laktaselösung, zu einer zweiten (Kontrollprobe) die nämliche Menge der gekochten Laktaselösung, schüttelt kräftig, füllt auf 100 ccm auf, überschichtet mit 1 ccm Toluol und beläßt die Mischungen 24 Stunden im Brutschrank. Hierauf werden die Gemische in je einen 1 Litermeßkolben gespült, mit einigen Tropfen einer 40%igen Quecksilbernitratlösung geklärt, mit 10%iger Sodalösung neutralisiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Danach filtriert man die Lösungen, befreit sie durch pulverisiertes Zink von Quecksilber, filtriert wieder und bestimmt nunmehr die Menge, die von jeder der beiden $\frac{1}{2}$ %igen Zuckerlösungen verbraucht wird, um 10 ccm Fehlingsche Lösung zu reduzieren.

Werden hierbei z. B. 14 für das Spaltungsgemisch und 16,5 ccm für die Kontrolle mit abgetöteter Laktase erhalten, so ergibt sich hieraus nach der Proportion:

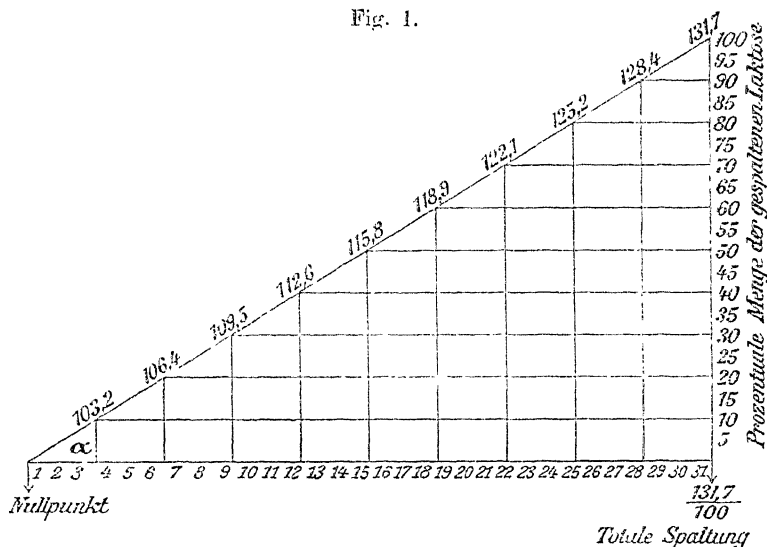
$$14 : 16,5 = 100 : x = \frac{1650}{14} = 117,8.$$

Aus diesem in irgend einem Fall für x erhaltenen Wert ermittelt nun Porcher die Anzahl Prozent aufgespaltener Laktose unter Zuhilfenahme des rechtwinkligen Dreiecks auf S. 74, auf dessen Hypothenuse eine Anzahl x-Werte eingetragen sind, während sich auf der dem spitzen Winkel α gegenüberliegenden Kathete (Ordinate) die Prozentzahl hydrolysierter Laktose findet. Eine parallel der dem spitzen Winkel α anliegenden Kathete (Abszisse) vom berechneten und auf der Hypothenuse eingetragenen Wert x ausgezogene Linie trifft die Ordinate in dem Punkt, der für den betreffenden Fall den gesuchten Prozentgehalt an aufgespaltenem Milchzucker bedeutet. So entspricht ein x-Wert von 103,2 : 10%, ein x-Wert von 115,8 : 50%, ein x-Wert von 118,9 : 60%, ein x-Wert von 131,7 : 100% aufgespaltener Laktose. Im vorliegenden Fall würde man also für den x-Wert 117,8 ca. 58% finden.

Zum Vergleich einer Anzahl laktasehaltiger Proben würde endlich wohl auch die Verfolgung der Spaltungsgemische durch die Zunahme der Kohlensäureentwicklung bei der Gärprobe geeignet sein. Wenngleich der Praktiker bei der Ausarbeitung der Maltase- und der Laktasebestimmung der Theorie vorgegriffen hat, dürfen die folgenden für die Beurteilung der Resultate wichtigen Feststellungen in keinem Falle außer acht gelassen werden.

Zwischen der Enzymkonzentration und den pro Zeiteinheit gespaltenen Milchezuckermengen besteht nach Armstrong¹⁾ angenäherte Proportionalität für nicht zu große und nicht zu kleine Enzymquantitäten. Sehr ge-

Fig. 1.



ringe Laktasemengen stellen ihre Wirksamkeit gegenüber dem Milchezucker nach kurzer Zeit ein, wie Armstrong annimmt, infolge einer Bindung des Enzyms durch die Spaltprodukte Glukose und Galaktose. Wird die Milchezuckerquantität verändert, so ergibt sich in Gegenwart von viel Laktase Proportionalität zwischen Zuckerkonzentration und den in der Zeiteinheit hydrolysierten Mengen, wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht.

Gespaltenen Milchezuckermengen in Prozenten

Milchezucker in 100 cem	Gespalten nach 3 Stunden	k. 10 ⁴
1,0 g	0,185	296
0,5 "	0,098	298
0,2 "	0,0416	337

Ist relativ viel Milchezucker vorhanden, so ergibt sich die prozentische Menge an gespaltenem Zucker als umgekehrt proportional

¹⁾ Armstrong, Proc. Roy. Soc. 73 (1904) 506.

der Zuckerkonzentration. Unabhängig von der Konzentration des Milchzuckers werden also in der Zeiteinheit gleiche absolute Mengen desselben gespalten. Am günstigsten ist für die Wirkung der Laktase wie für Invertase und Maltase eine schwach saure Reaktion des Mediums. Nach Bierry und Salazar¹⁾ liegt das Optimum bei der Salzsäurekonzentration von 0,02—0,04 ‰ (Wasserstoffionenkonzentration = 10^{-3}). Milchsäure übt einen spezifisch begünstigenden Einfluß aus²⁾; während die Laktase noch 1,6 ‰ Milchsäure verträgt, wirken schon 1,20 ‰ Essigsäure schädigend und 2,40 ‰ völlig paralysierend auf die Laktase, und von Oxalsäure und Schwefelsäure wirken noch viel geringere Konzentrationen lähmend³⁾.

Melibiose, Turanose, Gentiobiose und Cellobiose. Diese vier Disaccharasen sind noch wenig aufgeklärt; ja daß es sich bei diesen Enzymen um besondere Individuen handelt, ist noch keineswegs mit Sicherheit erwiesen. Für die Melibiose ist seinerzeit von E. Fischer⁴⁾ die Ansicht vertreten worden, daß es sich bei diesem Enzym nur um eine Maltase von etwas veränderten Eigenschaften handelt. Doch wird jetzt das die Melibiose zu d-Galaktose und d-Glukose hydrolysierende Enzym, das von Bau⁵⁾ Melibiose genannt worden ist, eher als eine β -Galaktosidase angesprochen, die jedoch mit der gegenüber Melibiose unwirksamen Laktase⁶⁾ nicht identifiziert werden kann. Für den Nachweis der Melibiose, die in Unterhefen vorkommen kann und nicht selten erst durch Anpassung auftritt⁷⁾, dient die Abnahme der starken Rechtsdrehung der Melibiose ($\alpha_D = +129,38^\circ$) unter dem Einfluß des wäßrigen Auszugs oder der getrockneten, Melibiose führenden Hefe.

Noch ungewisser ist, ob die spaltenden Agenzien der β -Glukose-Glukoside Turanose und Gentiobiose, die sich in Pilzextrakten und

¹⁾ Bierry u. Salazar, Compt. rend. 139 (1904) 381; Soc. Biol. 57 (1904) 181.

²⁾ Bokorny, Malys Jahrb. 33 (1903) zitiert nach Euler, Allg. Chem. d. Enzyme (1910) 122, und Bokorny, Milch-Ztg. 32 (1903) 641.

³⁾ Die paralysierende Minimalkonzentration der H_2SO_4 beträgt 0,09—0,10 ‰.

⁴⁾ E. Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 26 (1898) 61.

⁵⁾ Bau, Chem.-Ztg. 19 (1895) 1873; Wochenschr. f. Brauerei 19 (1903) 44. 20 (1903) 560.

⁶⁾ Emil Fischer u. Armstrong, Ber. d. chem. Ges. 35 (1902) 3144; Ges. Abhandl. S. 673.

⁷⁾ Dienert, Compt. rend. 129 (1899) 63.

käuflichem Emulsin vorfinden, als besondere spezifische Enzyme anzusprechen sind, wie dies Bourquelot¹⁾ voraussetzt; und für das aus Cellulose durch Säurespaltung darstellbare β -Glukose-Glukosid, die Cellobiose, ist es ebenfalls nicht bestimmt, ob die Fähigkeit zu seiner Aufspaltung, welche Emil Fischer und Geza Zemplén²⁾ sowie eine Anzahl anderer Forscher³⁾ beim Emulsin, bei *Saccharomyces Kefir*, bei Schimmelpilzen, Bakterien und im Darm junger Tiere feststellten, einem selbständigen Enzym, der Cellobiase oder Cellase⁴⁾ zuzuschreiben sind, oder ob sie dem β -Ferment des Emulsins zukommen. Bertrand hat gegen die letztere Auffassung geltend gemacht, daß Mandel-emulsin 70—80mal kräftiger auf Amygdalin wirkt als auf Cellobiose, während das entsprechende Ferment aus Weizen das umgekehrte Verhalten zeigt. Doch könnte diese Verschiedenheit auch durch die ungleichen Begleitstoffe des Enzyms in beiden Fällen bedingt sein.

b) Trisaccharasen.

Raffinase. Hierher gehört die Raffinase oder Lävulopolyase (Bierry), welche imstande ist, die Raffinose in Fruktose und Melibiose zu zerlegen, im Gegensatz zum Emulsin, das nach Neuberg und Marx⁵⁾ die Raffinose in Rohrzucker und Galaktose spaltet. Bau⁶⁾ identifiziert dieses Enzym mit der Invertase, wogegen die Indifferenz invertasehaltiger tierischer Säfte (wie des Darmsaftes des Pferdes) gegenüber Raffinose und die Tatsache ins Feld zu führen sind, daß Raffinose spaltende Hefen, wie *Schizosaccharomyces Octosporus*⁷⁾, Rohrzucker unverändert lassen, während umgekehrt einige Rohrzucker spaltende Kahlhefen Raffinose nicht anzugreifen vermögen. Der letztere Einwand ließe sich allerdings durch die Annahme von

¹⁾ Bourquelot, Compt. rend. de la Soc. Biol. 55 (1903) 386 und Fußnote 3, folgende Seite.

²⁾ Emil Fischer u. Geza Zemplén, Ann. d. Chem. 365 (1909) 1, 372 (1910) 254.

³⁾ Pringsheim u. Geza Zemplén, Zeitschr. f. physiol. Chem. 62 (1909) 367; Porcher, Soc. Biol. 68 (1910) 150.

⁴⁾ Bertrand u. Holderer, Compt. rend. 150 (1910) 230; Ann. Inst. Pasteur 24 (1910) 180; Bertrand u. Compton, Ebenda 24 (1910) 931; Compt. rend. 151 (1910) 1076 153 (1911) 360.

⁵⁾ Neuberg u. Marx, Biochem. Zeitschr. 3 (1907) 519.

⁶⁾ Bau, Wochenschr. f. Brauerei 20 (1903) 560.

⁷⁾ E. Fischer u. Lindner, Ber. d. chem. Ges. 28 (1895) 3034; Lindner, Wochenschr. f. Brauerei (1900) Heft 48 ff.

Armstrong¹⁾, daß der Galaktoserest auf die Aufspaltung des Rohrzuckerkomplexes hemmend wirkt, beseitigen.

Für den Nachweis der Raffinase wird sowohl die Abnahme der Rechtsdrehung, die bei vollständiger Spaltung der Raffinose bis auf 0 absinkt, wie die Zunahme des Reduktionsvermögens des Reaktionsgemisches benutzt. Auch dient demselben Zweck die Identifizierung der Spaltprodukte mit Hilfe der Osazonprobe. Das Melibiosazon zeigt den Schmelzpunkt 178—179° und ist in Alkohol, Eisessig, Pyridin und Aceton leicht löslich, schwer löslich dagegen in Wasser, Aether, Essigester, Benzol und Chloroform, während die Merkmale des Lävulosazons, das bekanntlich identisch mit dem Glukosazon ist, schon im vorigen beschrieben sind.

Noch weniger studiert als die unter anderem auch in Schimmelpilzen²⁾ nachgewiesene Raffinase sind die übrigen aufgefundenen oder vermuteten Trisaccharasen, so die in *Aspergillus niger* vorkommende Melezitase, welche die Melezitose der Brançon-Manna zu Glukose und Turanose hydrolysiert³⁾, die vielleicht mit Invertase identische Gentianase, die die Gentianose in Gentiobiose und Fruktose zerlegt⁴⁾, und die Rhamninorhamnase, welche eine Zerlegung des Trisaccharids Rhamninorhamnose in Rhamnose und Galaktose bewirkt⁵⁾. Die Ermittlung von Trisaccharasen käme außer in den erwähnten Kryptogamen⁶⁾ und im Emulsin nach neueren Untersuchungen⁷⁾ auch bei einer Anzahl Wirbelloser in Betracht.

Nach denselben Prinzipien wird auch die Gentianase ermittelt, unter deren Einwirkung die Rechtsdrehung der Gentianoselösung in-

¹⁾ Armstrong u. Glover, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 80 (1908) 312; siehe hierzu auch Bourquelot, Journ. Pharm. Chim. [6] 11 (1910) 1; Derselbe u. Bridel, Ebenda [7] 3 (1911) 569; Compt. rend. 152 (1911) 1060.

²⁾ Bourquelot, Soc. Biol. 48 (1896) 205; Gillot, Bull. acad. belge (1899) 211.

³⁾ Bourquelot, Compt. rend. 126 (1898) 1045; Derselbe u. Hérissé, Ebenda 135 (1902) 399; Ann. Chim. Phys. [7] 27 (1902); Bourquelot, Soc. Biol. 55 (1903) 386; Compt. rend. 136 (1903) 762; Derselbe u. Hérissé, loc. cit. bei Trehalase.

⁴⁾ Bourquelot, Compt. rend. 126 (1898) 1045; Journ. Pharm. Chim. [5] 16 (1902) 578; Bierry, Biochem. Zeitschr. 44 (1912) 426 und loc. cit.

⁵⁾ Bierry, Soc. Biol. 66 (1909) 738.

⁶⁾ Siehe außer den erwähnten Colin, Hydrolyse de quelques polysaccharides par la botrytis cinérea, thèse de la faculté de sciences de Paris, 1911.

⁷⁾ Giaja u. Gompel, Compt. rend. Soc. Biol. 62 (1907) 1197, 63 (1907) 508; Barthet u. Bierry, Ebenda 64 (1908) 735; Bierry, Compt. rend. 148 (1909) 949; Biochem. Zeitschr. 44 (1912) 426.

folge der Abspaltung von Lävulose in Linksdrehung und bei weiterer Zerlegung der Gentiobiose durch das Auftreten von zwei Molekülen Dextrose wiederum in Rechtsdrehung umschlägt. Das Reduktionsvermögen, das vor der Spaltung den Wert 0 besitzt, nimmt dagegen fortwährend zu. Auch hier ist die Darstellung der Osazone, von denen das Gentiobiosazon den Schmelzpunkt 142° und das Lävulosazon die schon erwähnten Eigenschaften zeigt, zu empfehlen.

e) Tetrasaccharasen.

Stachyase. Wenn möglich noch unsicherer als die Existenz besonderer Trisaccharid spaltender Fermente ist diejenige eines das Tetrasaccharid Stachyose letzten Endes in ein Molekül Fruktose, ein Molekül Glukose und zwei Moleküle Galaktose zerlegenden Enzyms. Nach Vintilesco¹⁾, Neuberg und Lachmann²⁾ würde auch hier zunächst der Fruktosekomplex abgespalten, nach dem erstgenannten durch Invertase oder Raffinase. Die dabei entstehende Maninotriose wäre es dann, die nach Bierry und Barthet³⁾ in Gegenwart eines besonderen Fermentes, das sich im Verdauungssaft von Krustazeen und Molusken, sowie im Emulsin (Vintilesco) vorfindet, in Fortsetzung des Stufenabbaus zunächst in Galaktose und eine Biose zerfällt. Die letztere würde ihrerseits zu Galaktose und Glukose abgebaut. Auch hier beruht der Nachweis des Stachyose spaltenden Enzyms — gleichviel, ob dasselbe eine besondere Individualität besitzt, oder als eine Summe in ihren Wirkungen hintereinandergeschalteter, bekannter Enzyme betrachtet wird — auf der Abnahme der Rechtsdrehung der Stachyose und darauf, daß die ursprünglich nicht reduzierende Lösung in immer steigendem Maße diese Fähigkeit im Verlauf der Stachyose-spaltung erlangt. Zur Ergänzung dieser Methoden kann man aus dem Spaltungsgemisch Glukosazon bzw. Fruktosazon und Galaktosazon (vom Schmelzpunkt $188\text{--}193^{\circ}$) darstellen, welch letzteres sich in 60%igem Weingeist leicht, in heißem Wasser und Alkohol etwas, in Aether, Benzol und Chloroform gar nicht löst.

d) Polysaccharasen, welche die kompliziertesten Kohlenhydrate spalten.

Diastase (Amylase). Die Kenntnis der Wirkungen dieses Fermentes reicht bis in die letzten Dezennien des 18. Jahrhunderts

¹⁾ Vintilesco, Journ. Pharm. Chim. 30 (1909) 167.

²⁾ Neuberg u. Lachmann, Biochem. Zeitschr. 24 (1910) 171.

³⁾ Bierry u. Barthet, Soc. Biol. 67 (1909) 13; Compt. rend. 152 (1911) 465, 904; Bierry, Biochem. Zeitschr. 44 (1912) 446.

zurück, als Irvine¹⁾ die Verzuckerung der Stärke durch Malz konstatierte. Eingehender hat sich mit den nämlichen Wirkungen Kirchhoff²⁾ befaßt. Das wirksame Prinzip selbst wurde jedoch erst im Jahre 1833 von Payen und Persoz³⁾ sowie von de Saussure⁴⁾ gefaßt. Der letztere fand, daß diese von Payen und Persoz als Diastase bezeichnete Substanz, welche sie durch Ausfällen mit Alkohol zu reinigen suchten⁵⁾, an das Muzin des Klebers gebunden ist.

Der Diastase kommt die denkbar größte Verbreitung zu. Denn da die Stärke und verwandte höhere Kohlenhydrate eines der wichtigsten Nährmaterialien fast aller Organismen darstellen und da dieses Nährmaterial als solches infolge seines hochmolekularen kolloiden Charakters nicht imstande ist, durch die Zellmembranen zu diosmieren, so muß jedes Lebewesen von den höchsten bis zu den niedrigsten über Werkzeuge verfügen, welche das nicht direkt verwertbare Substrat in resorbierbare Form zu bringen vermögen⁶⁾. Als Werkzeuge dieser Art fungieren die zahlreichen diastatischen Fermente, die man wohl als durch Anpassung an die verschiedenen Modifikationen der Stärke entstandene, gegenüber Temperaturerhöhung⁷⁾, Neutralsalzen⁸⁾ und

¹⁾ Irvine, loc. cit. *Allg. Teil*; siehe auch Payen u. Persoz, Ann. Chim. Phys. 53 (1833) 73, 56 (1834) 337; Payen, Ebenda 60 (1835) 441.

²⁾ Kirchhoff, loc. cit. *Allg. Teil*; Schweigels Journ. 14 (1815) 389; siehe auch Dubrunfaut, Mém. sur la saccharific. Soc. agricult., Paris 1823.

³⁾ Payen u. Persoz, loc. cit. vorletzte Fußnote, siehe auch *Allg. Teil*.

⁴⁾ De Saussure, loc. cit. *Allg. Teil*; Pogg. Ann. 32 (1834) 194.

⁵⁾ Analog verfahren auch spätere Forscher zur Reingewinnung der Diastase: Dubrunfaut, Dingers polyt. Journ. 187 (1868) 491; Zeitschr. f. ges. Brauwesen 3 (1880) 90; Mialhe, Compt. rend. 20 (1845) 954; Baranetzki, Die stärkeumbildenden Fermente in den Pflanzen, Leipzig 1878, S. 10; Duquesnel, Bull. terap. 87 (1874) 20. Ueber andere Methoden der Reindarstellung der Diastase siehe Lindner, Journ. f. prakt. Chem. [N. F.] 34 (1886) 378, 36 (1887) 481; Cohnheim, Virchows Arch. 28 241; v. Wittich, Pflügers Archiv 2 (1869) 196; Zulkowsky u. König, Wiener akad. Ber. 71 (1875) II, 453; Zulkowsky, Ebenda 77 (1878) II, 647; Danilewski, Virchows Archiv 25 (1882) 279; Größ, Jahrb. f. wiss. Botanik 26 (1894) 379; Osborne u. Campbell, Journ. Amer. Chem. Soc. 18 (1896) 1159; Ber. d. chem. Ges. 29 (1896) 1159; Wroblewski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 24 (1898) 173; Ber. d. chem. Ges. 31 (1898) 1130; siehe daselbst zahlreiche Literaturangaben über ältere Arbeiten; Fränkel u. Hamburg, Hofmeisters Beitr. 8 (1906) 389; Peters, Journ. Biol. Chem. 5 (1908) 367; Sherman u. Schlesinger, Journ. Amer. Chem. Soc. 33 (1911) 1195, 34 (1912) 1104; Přibram, Biochem. Zeitschr. 44 (1912) 293.

⁶⁾ Fermi, Archiv f. Hyg. 10 (1890) 1; Zentralbl. f. Bakt. 12 (1892) 713, zeigte, daß diese Wirkung nicht an den Lebensprozeß selbst gebunden ist, sondern enzymatische Natur besitzt.

Giften¹⁾ ungleich empfindliche Abarten²⁾ einer und derselben Diastase betrachten muß. Deshalb finden wir überall in der Natur, wo sich Stärke umsetzt, eine Diastase, die nach Haberlandt³⁾ auch im Pflanzenreich als ein echtes Sekretionsprodukt⁴⁾ von Drüsengewebe⁵⁾ analog demjenigen der tierischen Speicheldrüsen zu betrachten ist.

Brown u. Morris⁶⁾, denen sich Größ^{7a)} in verschiedenen Punkten angeschlossen hat, unterscheiden bei pflanzlichen Diastasen eine „Sekretionsdiastase“ (in den keimenden Samen), eine „Translokationsdiastase“ (in den ruhenden Samen) und außerdem die Zellwand lösende Zytase. Die Temperaturoptima dieser diastatischen Fermente sind verschieden (55° für die Sekretionsdiastase, 45° für die Translokationsdiastase). Nach ihrer Wirkung scheint das Auseinanderhalten zweier Diastasen: eines Stärke nur zu Dextrin spaltenden (Sekretionsdiastase?) und eines Dextrin, nicht aber unveränderte Stärke angreifenden Enzyms (Translokationsdiastase?), berechtigt zu sein^{8a)}. Ein wichtiges Argument für diese Auffassung bildet die von Grützner⁹⁾, Bourquelot¹⁰⁾, Pottevin¹¹⁾, Fernbach u. Schoen¹²⁾ festgestellte Tatsache, daß nur die saccharifizierende, nicht aber die

⁷⁾ Defresne, *Compt. rend.* 89 (1879) 1070; Bourquelot, *Ebenda* 104 (1891) 71; Biernacki, *Zeitschr. f. Biol.* 28 (1891) 49.

⁸⁾ Nasse, *Pflügers Archiv* 11 (1875) 145.

¹⁾ Müller, *Journ. f. prakt. Chem.* [N. F.] 10 (1874) 444.

²⁾ Nach Pugliese, *Pflügers Archiv* 69 (1897) 115, reichen die von den erwähnten Forschern sowie von Vernon, *Journ. Physiol.* 28 (1902) 156, aufgefundenen Differenzen jedoch überhaupt nicht aus, um eine Verschiedenartigkeit der Diastase ungleicher Herkunft zu postulieren. Dieser Forscher macht vielmehr ungleichartige Beimengungen für die Unterschiede verantwortlich.

³⁾ Haberlandt, *Ber. d. bot. Ges.* 8 (1891) 40.

⁴⁾ Nach Baranetzki, *Die stärkeumbildenden Fermente in den Pflanzen*, Leipzig 1878; Reychler, *Ber. d. chem. Ges.* 22 (1889) 414; Brown u. Morris, *Journ. Chem. Soc.* 57 (1890) 493, wird die Diastase als Zymogen ausgeschieden, das erst beim Stehen oder Ansäuern in das wirksame Ferment übergeht.

⁵⁾ Als Sekretionsorgan der Diastase soll bei den Gramineen die Kleberschicht des Endosperms fungieren; siehe Haberlandt, *loc. cit.* vorletzte Fußnote; Tangl, *Sitzungsber. d. Wien. Akad., math.-naturwiss. Kl.* 92 (1885) 72; A. Girard, *Ann. Phys. Chim.* [6] 3 (1884) 289. Brown u. Morris, *Journ. Chem. Soc.* 57 (1890) 493, haben demgegenüber beim Gerstenkeimling festgestellt, daß das Absorptivepithel des Skutellums die Diastase sezerniere.

⁶⁾ Brown u. Morris, *Journ. Chem. Soc.* 57 (1890) 507.

^{7a)} Größ, *Festschr. f. Schwendener*, Berlin 1899, S. 184.

^{8a)} Siehe Wijsman, *Rec. trav. chim. Pays-Bas* 9 (1890) 1; Pottevin, *Thèse*, Paris 1899; *Ann. Inst. Pasteur* 13 (1899) 665; Beyerinck, *Zentralbl. f. Bakt.* [2] 1 (1895) 221; Fränkel u. Hamburg, *Hofmeisters Beitr.* 8 (1906) 389.

⁹⁾ Grützner, *Pflügers Archiv* 12 (1876) 285.

¹⁰⁾ Bourquelot, *Compt. rend.* 104 (1887) 576.

¹¹⁾ Pottevin, *loc. cit.*

¹²⁾ Fernbach u. Schoen, *Compt. rend.* 151 (1910) 891,

stärkelösende Wirkung durch Erhitzen auf ca. 80° vernichtet wird, und daß Neutralisierung der Lösung gegen Phenolphthalein in entgegengesetztem Sinn auf die Temperaturempfindlichkeit der beiden Fermenteffekte einwirkt, wobei die Stärkelösung (Amylasewirkung) geschützt, die Zuckerbildung aus Dextrin (Dextrinasewirkung) dagegen noch mehr geschädigt wird (Neutralisierung gegen Methylorange setzt dagegen die Tötungstemperatur beider herab). Ferner spricht für die Zweienzymtheorie, die allerdings mit entgegengesetztem Resultat einerseits von Fränkel und Hamburg¹⁾, anderseits von Reinitzer²⁾ durchgeführte Trennung des stärkeverflüssigenden und des sacharifizierenden Anteils durch fraktionierte Dialyse; auch sprechen dafür die ungleichen Ergebnisse der verschiedenen Methoden der Amylaseermittlung, je nachdem das Prinzip der Stärkeverflüssigung, des Verschwindens der Blaufärbung mit Jod oder der Bestimmung des gebildeten Zuckers zugrunde gelegt wird. Auch der Umstand kann hier angeführt werden, daß gewisse Hefen, wie *Saccharomyces ellipsoideus*, *pastorianus*, *Logos*, *Pombe*, *Schizosaccharomyces octosporus* und *Moniliaarten* nur Dextrine spalten³⁾. Doch könnte dies auch eine Folge des Endoenzymcharakters der Amylase sein, für welche die Verflüssigung unveränderter Stärke naturgemäß nicht in Frage kommt⁴⁾. Bei tierischen Diastasen unterscheidet man nach den Organen und Sekreten, in denen sie sich finden, Amylase des Speichels, des Dünndarms, des Pankreas, der Leber und des Blutes.

Daß die Diastasen für die gesamte Stärkelösung im Bereich der Lebewesen verantwortlich zu machen sind, hat mit besonderem Nachdruck Dettmer⁵⁾ vertreten, während Wortmann⁶⁾ die Berechtigung dieser Auffassung bestreitet, da er einerseits in nicht stärkeführenden Organen Diastase nachgewiesen, anderseits in Organen mit lebhafter Stärkeumsetzung deren Fehlen konstatiert haben will. Der letztere Punkt wurde durch Brown und Morris⁷⁾ widerlegt, der erstere ist nicht beweisend, da sich Diastase, für welche die Pflanze zu Zeiten geringen Kohlenhydratbedarfs nur unzureichende Verwendung besitzt, in stärkefreie Organe zurückziehen kann. Die Pflanze legt gleichsam das Werkzeug beiseite, sobald sie dessen vorübergehend nicht bedarf, um es an den Ort seiner natürlichen Wirksamkeit zurückzuführen, sobald sie für seine Erzeugnisse wieder Verwendung findet. So scheint es ganz natürlich, daß stärkeführende Pflanzenteile, z. B. Zwiebeln, nach den Beobachtungen von Krauch⁸⁾ völlig diastasefrei sein können.

¹⁾ Fränkel u. Hamburg, loc. cit.

²⁾ Reinitzer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 61 (1909) 352.

³⁾ Siehe Lindner, Wochenschr. f. Brauerei 17 (1899) 713; Petit, Compt. rend. 128 (1899) 1176.

⁴⁾ Siehe demgegenüber die für die Einheitlichkeit der Diastase eintretenden Arbeiten von Slosse u. Limbosch, Arch. internat. de Physiol. 6 (1908) 4; Arch. di Fisiol. 7 (1909) 100, sowie die Auffassung von Chrzaszcz, Zeitschr. f. Spirit.-Ind. 31 (1908) Nr. 6; Wochenschr. f. Brauerei 28 (1911) 510; Zentralbl. f. Bakt. 7 (1890) 655, und die Auffassung von Wohl u. Glimm, Biochem. Zeitschr. 27 (1910) 349.

⁵⁾ Dettmer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 7 (1882) 1.

⁶⁾ Wortmann, Bot.-Ztg. 48 (1890) Nr. 37 ff.

⁷⁾ Brown u. Morris, Journ. Chem. Soc. London 63 (1893) 604.

⁸⁾ Krauch, Landwirtsch. Versuchsstat. 23 (1877) 77.

Während der Keimung tritt, dem wachsenden Bedarf entsprechend, eine Vermehrung der Amylase ein, die in den ruhenden Samen nach Kjeld¹⁾ nur spärlich vertreten ist²⁾. Merkwürdigerweise geht die Lebensdauer amylolytischer Samen weit über diejenige der Samen weit hinaus³⁾, und auch gegenüber Wasser und Chloroform hat sich nach Apsit u. Gain⁴⁾ die Samenamylase als sehr widerstandsfähig erwiesen.

Nicht nur bei der Keimung der Samen, sondern auch bei der Bildung der Keimkeime tritt die Diastase in Tätigkeit⁵⁾. Ueber sonstige Fundstätten in anderen Organen, Blättern, Wurzeln, Knollen, Pollen haben insbesondere Baranetzki⁶⁾, Mulder⁷⁾, Erlenmeyer⁸⁾, Hansen⁹⁾, Brasse¹⁰⁾, Gonnermann¹¹⁾, Saiki¹²⁾, Krauch¹³⁾ und Butkewitsch¹⁴⁾ berichtet. Auch bei toten Samen sind Diastasen, die teils nur Stärke zu Dextrin spalten, teils nur Stärke in Zucker, weit verbreitet, so bei Myxomyceten¹⁵⁾, Algen¹⁶⁾, Pilzen¹⁷⁾.

¹⁾ Kjeldahl, Résumé de Laborat. Carlsberg 1 (1879); siehe Malys Jahrb. 380) 381.

²⁾ Siehe auch über Diastase ruhender Samen Tanaka, Coll. Engin. Tokyo 3; Malys Jahrb. (1908) 828; Chrzączasz, Zeitschr. f. Spiritusind. 32 (1909) 45—50; Wohlleben, Untersuch. über die Ausscheid. von Enzymen, Dissert., zitiert 1911; Biochem. Zentralbl. 12 (1911) 2781.

³⁾ Siehe die Angaben von Brocq, Rousseau u. Gain, Compt. rend. 148 (8) 359; Bruschi, Ann. Bot. 22 (1908) 449; White, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 81 (1909) 417.

⁴⁾ Apsit u. Gain. Compt. rend. 149 (1909) 58.

⁵⁾ Siehe Tischler, Jahrb. f. wissensch. Bot. 47 (1910) 219.

⁶⁾ Baranetzki, loc. cit. Fußnote 4, S. 80.

⁷⁾ Mulder, Chemie des Bieres, Leipzig 1858, S. 226.

⁸⁾ Erlenmeyer, Münchner akad. Ber. (1884) II, 204.

⁹⁾ Hansen, Arbeiten d. bot. Instituts Würzburg 3 (1884) 271.

¹⁰⁾ Brasse, Compt. rend. 99 (1884) 878.

¹¹⁾ Gonnermann, Chem.-Ztg. (1895) 1806.

¹²⁾ Saiki, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48 (1906) 469.

¹³⁾ Krauch, Landwirtschaftl. Versuchsstat. 23 (1877) 77.

¹⁴⁾ Butkewitsch, Biochem. Zeitschr. 10 (1908) 314.

¹⁵⁾ Wortmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 6 (1882) 324.

¹⁶⁾ Kosmann, Bull. Soc. Chim. Paris 27 (1877) 251.

¹⁷⁾ Bourquelot, Bull. Soc. Mycol. France IX, 230, X, 235; Gayon u. Bourquelot, Ann. Inst. Pasteur 1 (1886) 532; Schäffer, Beitr. zur Kenntnis der in einigen Schimmelpilzen hervorgebrachten Enzyme, Dissert., Erlangen 1900; Kohnstamm, Die holzzerstörenden Pilze, Dissert., Erlangen 1900; J. Zellner, Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wiss. II b, 118, 3. Abt.; Zeitschr. f. wiss. Bot. 31 (1898) 599; Jourde, Soc. Biol. 63 (1907) 264; Zellner u. Rapp, Ber. d. chem. Ges. 31 (1898) 209. Siehe Literatur über das Vorkommen und die Unterschiede der einzelnen Diastasen im Pflanzen- und Tierreich: Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, Leipzig 1913, Bd. 1, S. 308; vgl. auch v. Gorup-Besanez, Neues Repert. d. Pharm. 25 (1876) 28; Ber. d. chem. Ges. 7 (1875) 1478, 8 (1876) 1510; v. Gorup u. Will, Neues Repert. Pharm. 24 (1875) 506.

Bei der außerordentlichen Verbreitung der Diastase kommt ihrem Nachweis und ihrer Bestimmung die größte Bedeutung zu.

Der Diastasenachweis bietet keinerlei Schwierigkeiten, da sich die Stärkespaltung unter dem Einfluß dieses Fermentes sowohl durch die Lösung der Stärke und das Verschwinden der blauen Jodstärkefärbung, wie durch den Nachweis der Dextrine und des gebildeten Zuckers nach einer der bekannten Methoden führen läßt.

Bei der quantitativen Diastasebestimmung macht sich dagegen der Mangel genauer Kenntnisse der Gesetzmäßigkeiten der Diastasewirkung fühlbar. Nicht einmal für Diastasen der nämlichen Herkunft stimmen die Angaben verschiedener Autoren miteinander überein. So stellte Dücker¹⁾ für die Speicheldiastase²⁾ fest, daß zwischen deren Menge und der gebildeten Zuckerquantität Proportionalität besteht, und die nämliche Proportionalität konstatierte Taylor zwischen der Enzymkonzentration und der in der Zeiteinheit gespaltenen Stärkequantität, geradeso wie dies Henri³⁾ für eine pflanzliche Diastase aufgefunden hat. Demgegenüber fanden Brown und Glendinning⁴⁾ ebenfalls für die Speicheldiastase Proportionalität zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Quadratwurzel aus der Enzymkonzentration. Eine dem Schützschens Zeitgesetz⁵⁾

$$E \cdot \sqrt{t} = x$$

für die Pepsinverdauung analoge Gesetzmäßigkeit stellte Klempin⁶⁾ für die Haferdiastase fest. Für eine Geschwindigkeit, die geringer ist, als die Proportionalität mit der Enzymmenge verlangen würde, sprechen auch die Beobachtungen von Simon⁷⁾. Ch. Philoche⁸⁾ wiederum hat die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Fermentkonzentration durch die Formel ausgedrückt:

$$v = B \cdot c - A \cdot c^2,$$

wenn v die Geschwindigkeit, c die Fermentkonzentration und A und B Konstanten sind. Maszewski⁹⁾ und Bjelfeld¹⁰⁾ endlich haben

¹⁾ Dücker, Beitr. z. Kenntnis der Ptyalinwirkung, Inaug.-Diss., Bern 1906.

²⁾ Berzelius war der erste, der für das stärkespaltende Prinzip des Speichels die Bezeichnung Ptyalin eingeführt hat, vgl. Schlesinger, Virchows Archiv 125 (1891) 146, woselbst sich auch weitere geschichtliche Angaben finden.

³⁾ Henri, Lois générales de l'action des diastases, Thèse, Paris 1903, S. 114.

⁴⁾ Brown u. Glendinning, Journ. Chem. Soc. 81 (1902) 381.

⁵⁾ Siehe bei Pepsin.

⁶⁾ Klempin, Biochem. Zeitschr. 10 (1908) 206.

⁷⁾ Simon, Journ. Physiol. Pathol. 9 (1907) 261.

⁸⁾ Ch. Philoche, Journ. Chim. Physique 6 (1908) 213, 355.

⁹⁾ Maszewski. Zeitschr. f. physiol. Chem. 31 (1900) 58.

einen Einfluß der Enzymquantität auf die Geschwindigkeit der Stärkespaltung überhaupt in Abrede gestellt.

Ebensowenig geklärt ist die Beziehung, welche zwischen der Geschwindigkeit der Stärkespaltung unter dem Einfluß der Diastase und der Substratkonzentration besteht. Brown und Glendinning¹⁾ drückten ihre Versuchsergebnisse an Malzdiastase durch die Formel aus:

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}.$$

Kendall und Sherman²⁾ sprachen sich für die Gültigkeit der Formel aus:

$$\frac{dx}{dt} = k \frac{(a-x)}{a+x} - k_1 \frac{x}{a}$$

(resp. ihr Integral), während V. Henri³⁾ für Malz- und Pankreasdiastase und Taylor für Speicheldiastase, sowie van Laer⁴⁾ in manchen Fällen⁵⁾ für die Gültigkeit der Gleichung von Reaktionen erster Ordnung eintreten, vorausgesetzt, daß für die eigentliche Stärkespaltung nur die gebildete Maltose als Maß genommen wird. Ch. Philoche⁶⁾ hat aus ihren eingehenden an Malz-, Pankreas- und Takadiastase⁷⁾, sowie einem Merckschen Präparat ausgeführten Versuchen⁸⁾ auf viel kompliziertere Gesetzmäßigkeiten geschlossen. Es zeigte sich nämlich,

¹⁰⁾ Bielfeld, Zeitschr. f. Biol. 41 (1901) 360.

¹⁾ H. Brown u. Glendinning, Journ. Chem. Soc. 81 (1902) 388.

²⁾ Kendall u. Sherman, Journ. Amer. Chem. Soc. 32 (1910) 1087.

³⁾ V. Henri, Lois générales de l'action des diastases, Thèse, Paris 1903, S. 113, 114, hat die Formel:

$$K = \frac{a}{t} (1 + ma) \log \frac{a}{a-x} \quad \text{resp.} \quad \frac{dx}{dt} = \frac{(ka-x)}{1+ma}$$

analog seiner Formel für die Invertasewirkung aufgestellt.

⁴⁾ van Laer, Bull. Acad. Royal de Belgique (1910) 707, (1911) 84, 305, 362, 795; Bull. Soc. Chim. de Belgique 26, 18.

⁵⁾ Bei Einwirkung von Lösungen frischer Diastase auf Stärke. Doch nahmen immerhin die Geschwindigkeitskoeffizienten in sehr diastasereichen Lösungen zu, während sie bei erhitzten Diastaselösungen kleiner wurden. Nach van Laer würde der Verzuckerungsprozeß selbst monomolekular erfolgen, entsprechend der zunächst gebildeten Stärke-Diastaseadsorptionsverbindung. Aber die Bildung dieser letzteren würde variieren.

⁶⁾ Ch. Philoche, Compt. rend. Soc. Biol. 58 (1905) 952.

⁷⁾ Als Takadiastase bezeichnet man das diastatische Ferment des *Aspergillus Oryzae*, des charakteristischen Bestandteils der Saké (Reiswein) liefernden japanischen Kojihefe.

⁸⁾ Die gebildete Maltose wurde nach dem Sistieren der Reaktion mittels Fehlingscher Lösung bestimmt, wobei die Zerstörung des Ferments durch Eingießen in siedendes Wasser bewirkt wird.

daß k erst dann und zwar bis fast zum Schluß konstant bleibt, wenn ca. 30 % der als Substrat dienenden löslichen Stärke umgesetzt sind. Wird das Ferment durch Erhitzen eliminiert und durch frisches ersetzt, so ist der Reaktionsverlauf ein anderer. Erwähnt sei noch die Angabe von Dücker (loc. cit.), daß bei Verwendung von Speichelamylase nach ungefähr einer Stunde der Prozeß sistiert (wie dies in noch viel ausgeprägterem Maß bei der Prüfung des Formaldehyds auf Diastasemodelleigenschaften¹⁾ H. Maggi und die Verfasserin beobachten konnten)²⁾, daß aber dieser Prozeß durch Zusatz von frischer Stärke³⁾ oder durch Temperaturerhöhung⁴⁾ wieder in Gang kommt. Ohne daß die Annahme falscher Gleichgewichte hier notwendigerweise herangezogen werden muß, ließe sich die Beobachtung von Dücker einfach im Sinne der gewöhnlichen Gleichgewichtsgesetze deuten, indem die Reaktion, welche in ihrem Verlauf von links nach rechts durch die angesammelten Spaltprodukte gehemmt worden ist, durch Vermehrung des auf der linken Seite stehenden Produktes wieder in Fluß gebracht werden kann.

Eine Hemmung von seiten der Spaltprodukte der Stärke ergibt sich aus dem Stillstand der Reaktion, wenn das Verhältnis Maltose 80 % zu Dextrin 20 % erreicht ist; ferner aus dem Wiedereinsetzen des Prozesses bei Eliminierung der Maltose durch Gärung oder Dialyse⁵⁾, sowie aus den Befunden von Wohl und Glimm⁶⁾. Die abweichenden Angaben von Brown und Heron⁷⁾, Müller-Thurgau⁸⁾ und Wortmann⁹⁾ für die Stärkeverflüssigung und von Kjeldahl (loc. cit.) für die Zuckerbildung mögen dadurch veranlaßt sein, daß für die erste Spaltungsphase auch die höher molekularen Dextrine, für die

¹⁾ Siehe die Einleitung S. 12.

²⁾ Woker, Ber. d. chem. Ges. 49 (1916) 2318; H. Maggi, Fermentforschung 2 (1919) 304—448.

³⁾ Siehe auch Moritz u. Glendinning, Journ. Chem. Soc. London 61 (1892) 689.

⁴⁾ Nach Vernon, Ergebn. d. Physiol. 9 (1910) 238 und van Laer, loc. cit., nimmt der Geschwindigkeitskoeffizient der Reaktion von 20—30° bzw. von 25—35° um das Doppelte zu. Bei höherer Temperatur ist der Temperaturquotient der beiden Geschwindigkeitskoeffizienten kleiner als 2 (für 10° Temperaturerhöhung).

⁵⁾ Lea, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 47 (1890) 192.

⁶⁾ Wohl u. Glimm, Biochem. Zeitschr. 27 (1910) 349.

⁷⁾ Brown u. Heron, Ann. Chem. 199 (1880) 247; Journ. Chem. Soc. London 35 (1879) 596.

⁸⁾ Müller-Thurgau, Landwirtsch. Jahrbücher (1885) 795.

⁹⁾ Wortmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 6 (1882) 324.

zweite Spaltungsphase dagegen nur die einfachen Zucker (Maltose) als Spaltprodukte zur Wirkung gelangen. Daß auch der Formaldehyd — ähnlich den Befunden bei der Diastase — in seinem Verflüssigungsvermögen gegenüber der Stärke, ganz entgegen seinem Verhalten bei der tiefergreifenden Spaltung, keiner Hemmungswirkung zu begegnen scheint, möge in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben.

Die Unstimmigkeiten zwischen den einzelnen Literaturangaben haben ihre Ursache zum Teil in der Ungleichartigkeit des verwendeten Substrates. Doch auch dort, wo durch die Verwendung von löslicher Stärke Komplikationen von seiten eines hauptsächlich von den französischen Autoren neben dem zuckerbildenden Enzym angenommenen stärkelösenden Enzyms¹⁾ ausgeschlossen sind, stimmen die Resultate nicht miteinander überein. Dies kann, von der Komplikation durch die verschiedenen Abbaustufen abgesehen, daher rühren, daß die fermentative Wirksamkeit der Diastase sehr empfindlich gegenüber selbst minimalen Beimengungen von fremden Stoffen ist²⁾. Aber auch der Beeinflussung des kolloiden Substrates sollte weit größere Beachtung geschenkt werden, als dies bis heute geschieht, namentlich da die Untersuchungen von Saméc³⁾ die Bedeutung der Anionen von Salzen und Säuren, sowie des Hydroxylions von Basen und hydrolytisch gespaltenen Salzen bei der Quellung der Stärke erwiesen haben, während anderseits eine Reduzierung des Neutralsalzeinflusses auf Ionenwirkungen bei der diastatischen Stärkespaltung Cole⁴⁾ durchführen wollte, indem er angibt, daß ganz allgemein Anionen die Diastasewirkung beschleunigen, während Kationen sie hemmen. In bezug auf die Wirksamkeit der verschiedenen Anionen auf den Diastaseeinfluß fand Cole eine der Hofmeisterschen Reihe der Beeinflussung von Kolloiden durch diese Ionen entsprechende Abstufung. Danach hätten Chloride und Sulfate die stärkste, Nitrate die schwächste fördernde Wirkung, während Bromide und Jodide die Mitte halten.

Starke Säuren, wie Salzsäure⁵⁾, wirken nur in ganz geringen

¹⁾ Siehe hierüber im folgenden S. 101, 102, 127, 128, sowie die früheren Erörterungen über zwei Diastasen von verschiedenartigem Charakter, S. 80 u. 81.

²⁾ Vgl. Ford, Journ. Soc. Chem. Ind., 23 (1904) 414; Zeitschr. f. Spirit.-Ind. 28 (1905) Nr. 1—4.

³⁾ Saméc, Kolloidchem. Beihefte 3 (1911/12) 123

⁴⁾ Cole, Journ. Physiol. 30 (1903) 202.

⁵⁾ Die hemmende Wirkung stärkerer Salzsäurekonzentrationen ist für die Frage von Bedeutung, inwieweit diastatisches Ferment, welches aus verschlucktem Speichel stammt, durch den Magensaft inaktiviert wird; siehe darüber Schlesinger, Virchows Archiv 125 (1891) 146; Langley, Amer. Journ. Physiol. 3,

Mengen beschleunigend auf den Prozeß der diastatischen Stärkespaltung¹⁾ [0,001 %²⁾ bildet nach Cole³⁾, 10^{-4} bis 10^{-5} nach Sörensen⁴⁾, 10^{-6} nach Ringer und v. Trigt⁵⁾ das Optimum, und nach Fernbach und Wolff⁶⁾ entspricht Neutralität gegenüber Methylorange dem Optimalpunkt]. Schon 0,015 % Salzsäure⁷⁾ bei 40° hemmen dagegen vollständig⁸⁾. Für schwache Säuren wird naturgemäß, da die Wasserstoffionen das wirksame Prinzip⁹⁾ darstellen, das Optimum entsprechend höher. Untersucht wurden Kohlensäure¹⁰⁾, Zitronensäure¹¹⁾, Essigsäure, Buttersäure und Milchsäure¹²⁾; auch für die Sali-

246, 4, 18; Kübel, Pflügers Archiv 77 (1898) 276; Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 9 (1908) 10; Cannon u. Day, Amer. Journ. Physiol. 9, 396.

¹⁾ Ueber die Begünstigung der Wirkung der Speicheldiastase durch schwach saure Reaktion des Mediums siehe ferner schon Astaschewsky, Zentrabl. f. d. med. Wiss. 16 (1878) 257; Chittenden u. Griswold, Amer. Chem. Journ. 3 (1882) 205.

²⁾ 0,007 ist nach Kübel, loc. cit., die obere Grenze der Beschleunigung durch Salzsäure.

³⁾ Cole, Journ. Physiol. 30 (1904) 202.

⁴⁾ Sörensen, Ergebn. d. Physiol. 12 (1912) 393.

⁵⁾ Ringer u. v. Trigt, Zeitschr. f. physiol. Chem. 82 (1913) 484.

⁶⁾ Fernbach u. Wolff, Compt. rend. 143 (1906) 380.

⁷⁾ Außerordentlich schädlich wirkt auch Flußsäure Effront, Bull. Soc. Chim. [3] 4 (1890) 627; Compt. rend. 115 (1892) 1324. 120 (1895) 1281; Compt. rend. Soc. Biol. 57 (1904) 234.

⁸⁾ Kübel, Pflügers Archiv 76 (1898) 276; 77 (1898) 276; Langley, Journ. Physiol. 3, 246, 4, 18; siehe demgegenüber die ältere entgegengesetzte Angabe von Richet, Journ. de l'Anat. et Physiol. 14, 285.

⁹⁾ Maquenne u. Roux, Compt. rend. 142 (1906) 1387, führen die Wirksamkeit der Wasserstoffionen auf eine Beschleunigung der Autoexzitation (Wirkungszunahme beim Stehen) der Malzextrakte zurück.

¹⁰⁾ Schierbeck, Skand. Arch. 3 (1892) 344; Müller-Thurgau, Landwirtschaft. Jahrbücher 14 (1885) 795. Für die Speicheldiastase geben demgegenüber jedoch Ebstein u. Karl Schulze, Virchows Archiv 134 (1893) 475, an, daß die Kohlensäure bei neutraler Reaktion der Lösung einen schädlichen Einfluß ausübe, während Dücker, Beitr. zur Kenntnis d. Ptyalinwirkung, Dissert., Bern 1906, bei konzentrierten Stärkelösungen Förderung, bei verdünnten Hemmung beobachtet hat. Sicher festgestellt ist dagegen eine Begünstigung der Diastasewirkung durch Kohlensäure in alkalischen Medien, da dieselbe die die Fermentwirkung paralysierende alkalische Reaktion aufhebt; siehe Kübel, loc. cit.; Chittenden u. Ely, Journ. Physiol. 3, 327; Chittenden u. Smith, Malys Jahrb. (1885) 256; Gans, Verhandl. d. Kongr. f. innere Medizin (1896) 449; Nasse, Pflügers Archiv 15 (1877) 477; Detmer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 7 (1882) 1.

¹¹⁾ Detmer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 7 (1882) 1.

¹²⁾ Kjeldahl, Zeitschr. f. ges. Brauwesen 3 (1880) 186.

zylsäure liegen Angaben vor, doch lauten dieselben widersprechend ¹⁾. Nach Krauch wirkt sie in keiner Weise ein, ebenso die Borsäure ²⁾. Bei der Oxalsäure ist gemäß ihrer Giftigkeit die Wirkung schädigend ³⁾, ebenso bei dem nach Salkowski ⁴⁾ durch seine Azidität wirkenden Saccharin.

Alkalien und alkalische Salze besitzen unter allen Umständen schon in ganz geringer Menge ⁵⁾ einen ungünstigen Einfluß ⁶⁾. So haben Wohlgemuth ⁷⁾ und Mac Guigan ⁸⁾ bei der Speichelamylase schon bei einer Konzentration des freien Alkalis ⁹⁾ von $\frac{1}{5000}$ — $\frac{1}{1500}$ -normal eine starke Fermentschädigung nachgewiesen. Auf der hemmenden Wirkung der Hydroxyl- wie der Wasserstoffionen auf die stärkespaltende Fähigkeit der Diastase gründet sich übrigens eine von R. W. Wood ¹⁰⁾ angegebene Methode der quantitativen Bestimmung der Hydrolyse.

Die Monoaminosäuren, wie Glykokoll und Leuzin, sowie Benzoylglykokoll (Hippursäure), das Asparagin, das Kreatinin und die Peptone sowie gekochte Infuse keimender Samen, die solche Eiweißabbauprodukte enthalten, sollen die Wirkung der pflanzlichen Diastasen begünstigen ¹¹⁾, während die Wirkung der Speichelamylase nur durch

¹⁾ Siehe Kjeldahl, loc. cit. vorige Fußnote; Krauch, Landwirtsch. Versuchsstat. 23 (1877) 77; Journ. de l'anat. physiol. 14, 285; Heusch, Arch. di farm. sper. 13 (1912) 307.

²⁾ Leffmann u. Beam, Analyst 13 (1888) 103; Agulhon, Compt. rend. 148 (1909) 1340; Ann. Inst. Pasteur 24 (1910) 495.

³⁾ John, Virchows Archiv 122 (1890) 271; Kübel, loc. cit.

⁴⁾ Salkowski, Virchows Archiv 120 (1890) 325.

⁵⁾ Schon Alkalispuren, die dem Glas der Gefäße, der Stärke oder dem Filter entstammen, sind nicht indifferent.

⁶⁾ Ford, Journ. Soc. Chem. Ind. 23 (1904) 414; Zeitschr. f. Spiritusind. 28 (1905) Nr. 1—4; Fernbach u. Wolff, Compt. rend. 143 (1906) 380; Chittenden u. Ely, Amer. Journ. Physiol. 3, 327; Chittenden u. Smith, Malys Jahrb. (1885) 256; Kübel, Pflügers Archiv 77 (1898) 276.

⁷⁾ Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 9 (1908) 10.

⁸⁾ Mac Guigan, Amer. Journ. Physiol. 10 (1904) 444.

⁹⁾ Soda übt noch in $\frac{1}{2500}$ -normaler Lösung einen stark schädlichen Einfluß aus. Bei der Pankreasamylase haben Grützner sowie Gans, Verhandl. d. Kongr. f. innere Medizin (1896) 449, eine Hemmung in 0,05%igen Sodalösungen festgestellt.

¹⁰⁾ R. W. Wood, Amer. Chem. Journ. 16 (1894) 313; ref. in Zeitschr. f. physik. Chem. 15 (1894) 502.

¹¹⁾ Effront, Soc. Biol. 57 (1904) 234; Effront-Bücheler, Die Diastasen, 1900, S. 126; Schneidewind, Meyer u. Münter, Landwirtsch. Jahrbücher 35 (1906) 911; Ford u. Guthrie, Wochenschr. f. Brauerei 25 (1908) 10 u. 11.

Peptone und Eiereiweiß¹⁾, nicht aber durch Glykokoll, Leuzin und Alanin befördert wird. Die beiden letztgenannten üben im Gegenteil einen hemmenden Einfluß aus. Die Pankreasamylase wiederum zeigt die sehr wertvolle Anpassungserscheinung, durch alle Aminosäuren, die ihr natürliches Medium bilden, aktiviert zu werden²⁾. Auch die Galle gibt einen unbekannten Aktivator des Saccharifikationsprozesses an den Darm ab³⁾. Für die Pankreas-, Darm-, Leber- und Serumamylase finden sich ferner zum Teil widersprechende Angaben über Aktivierungen und Paralsierungen durch Lipide, namentlich Lecithin⁴⁾.

Hinsichtlich der Wirkung der meisten Salze gehen die Angaben verschiedener Autoren, besonders wo sich diese Angaben auf Diastasen ungleicher Herkunft beziehen, noch sehr auseinander. Während Lintner⁵⁾ für pflanzliche Diastase angibt, daß Alkali- und Erdalkalisalze indifferent sind (was im Zusammenhang stehen würde mit der Angabe von Bierry⁶⁾, daß Phytoamylase im Gegensatz zu Amylasen tierischer Herkunft durch Dialyse⁷⁾ nicht inaktiviert wird), haben Fouard⁸⁾ Begünstigung der Stärkelösung durch salzhaltige Medien und Detmer⁹⁾ Förderung der Amylasewirkung durch Kochsalz¹⁰⁾ festgestellt, und Wohlgemuth (loc. cit.) hat sogar in Gegenwart von Kochsalz bei der Speicheldiastase regelmäßige Steigerungen der Wirkung um das 4—6fache, ja unter günstigen Bedingungen selbst Steige-

¹⁾ Roger, Soc. Biol. 64 (1908) 16, 64.

²⁾ Terroine u. J. Weill, Journ. de physiol. Pathol. 14 (1912) 437; Pazerski, Thèse Paris, 1902; Maly's Jahrb. (1902) 460.

³⁾ Um Gallensäure oder gallensaure Salze, denen von Buglia, Biochem. Zeitschr. 25 (1910) 239, u. Korentschewski, Arch. d. Scienc. Biol. de St. Petersburg 16 (1911) 271, eine solche Wirkung zugeschrieben worden ist, soll es sich nach Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 21 (1909) 447, der auch im Serum einen analogen Aktivator auffand [siehe Ebenda 33 (1911) 303], und Minami, Ebenda 39 (1912) 339, in diesem Falle nicht handeln.

⁴⁾ Lapidus, Biochem. Zeitschr. 30 (1910) 39; Centanni, Ebenda 29 (1910) 339; Starkenstein, Ebenda 33 (1911) 423; Minami, Ebenda 39 (1912) 355.

⁵⁾ Lintner, Journ. f. prakt. Chem. [N. F.] 34 (1886) II, 378; 36 (1887) 481.

⁶⁾ Bierry, Biochem. Zeitschr. 40 (1912) 357.

⁷⁾ Siehe hierüber Bierry, Giaja u. Henry, Soc. Biol. 60 (1906) 479, 62 (1907) 432; Compt. rend. 143 (1906) 300; Brunacci, Bull. scienc. med. 80, 243; Zentralbl. f. Biochem. 9 (1909) 1927; Preti, Biochem. Zeitschr. 4 (1907) 1.

⁸⁾ Fouard, Compt. rend. 147 (1908) 813.

⁹⁾ Detmer, Pflanzenphysiol. Untersuch. über Fermentbildung, 1883.

¹⁰⁾ Nach Effront, Compt. rend. 115 (1892) 1324, soll es sich jedoch nicht um das Kochsalz selber, sondern um eine Beimengung handeln, da nur das Kochsalz des Handels, nicht aber das chemisch reine diese Wirkung zeigen würde.

rungen um das 25fache beobachtet, und zwar erwiesen sich schon Kochsalzbeimengungen von 0,001 % als wirksam. Einen analogen Einfluß besitzen nach Wohlgemuth die Chloride des Kalium, Ammonium, Kalzium¹⁾, Barium und Magnesium²⁾, so daß Wohlgemuth wie auch Bierry (loc. cit.) das Chlorion als das wirksame Agens betrachten, das vielleicht auch als der aktivierende Bestandteil in (gekochtem) Speichel, Serum- und Pankreassaft aufgefaßt werden dürfte³⁾, doch kämen auch Phosphate in Frage⁴⁾. Nach Wolff und Fernbach⁵⁾ wiederum würde die Stärkespaltung, sei es durch Erhitzen, sei es durch Diastase, nur durch Chlorbarium gefördert. Einen schwächeren, aber immerhin noch deutlich fördernden Einfluß haben in Uebereinstimmung mit Cole (loc. cit.) Neilson und Terry⁶⁾ für das Brom- und Jodion konstatiert, während das Fluorion hemmt. In den großen Zügen mit diesen Ergebnissen übereinstimmende Resultate haben Grützner und Wachsmann⁷⁾ sowie Wohlgemuth bei der Pankreasamylase erhalten, indem sie zeigten, daß Kochsalz bis zu Konzentrationen von $\frac{1}{8}$ -normal die Diastasewirkung begünstigt und daß Bromnatrium und Jodnatrium gleichsinnig wirken, während dem Fluornatrium ein bedeutend schwächerer Einfluß zukommt. Diametral entgegengesetzt lauten dagegen die Angaben von Patten und Stiles⁸⁾, nach welchen das Chlorion hemmen, das Fluorion dagegen beschleunigen und die Kationen Kalzium, Natrium, Kalium, Ammonium und vor allem das Lithium wiederum hemmen sollen.

Wie auch bei anderen Neutralsalzwirkungen⁹⁾ verhalten sich

¹⁾ Die Pankreasdiastase soll nach Pozerski, *Compt. rend. Soc. Biol.* 55 (1903) 429, durch Kalziumsalze zerstört werden, während Guyénot, *Compt. rend. Soc. Biol.* 63 (1908) 768, angibt, daß die durch Dialyse [Slosse u. Limbosch, *Bull. Soc. Royal de Bruxelles* (1908) 80] entaktivierte Speicheldiastase durch Kalziumsalze wieder aktiviert werde.

²⁾ Nach Kübel, *Pflügers Archiv* 77 (1898) 276, wirkt das Kaliumion in Verbindung mit dem Chlorion noch etwas stärker als das Natriumion.

³⁾ Pozerski, loc. cit. Fußnote 1, diese Seite; vgl. auch *Soc. Biol.* 60 (1906) 1068; Roger, *Ebenda* 62 (1907) 833, 1019, 1021, 1070, 64 (1908) 541. Ueber die Wirkung der freien Halogene siehe Gerber, *Ebenda* 72 (1912) 1112, 73 (1912) 354; vgl. auch Derselbe. *Ebenda* 70 (1911) 822, 71 (1911) 41.

⁴⁾ Siehe im folgenden.

⁵⁾ Wolff u. Fernbach, *Compt. rend.* 145 (1907) 261.

⁶⁾ Neilson u. Terry, *Amer. Journ. Physiol.* 22 (1908) 43.

⁷⁾ Grützner u. Wachsmann, *Pflügers Archiv* 91 (1902) 195.

⁸⁾ Patten u. Stiles, *Amer. Journ. Physiol.* 17 (1906) 26.

⁹⁾ Vgl. *Allg. Teil* und *Spez. Teil*, 1. Abteil. im Kapitel: Katalyse durch Neutralsalze.

die Sulfate anders als die Chloride. Gegenüber der Speichelamylase sind die Sulfate völlig wirkungslos und die pflanzliche Diastase hemmen sie sogar¹⁾. Azetate und Oxalate üben ebenfalls einen hemmenden Einfluß auch auf die Speicheldiastase aus. Von den Phosphaten gibt Roger²⁾ an, daß ihre Entfernung durch Uransalze³⁾ eine Sistierung der Diastasewirkung nach sich ziehe, welche letztere erst nach Zusatz von Natriumphosphat wieder einsetze, und früher schon hat Effront (loc. cit.) die Begünstigung der Amylasewirkung durch Ammonium- und Kalziumphosphat erwähnt. Andererseits haben Bang⁴⁾ und Lisbonne⁵⁾ bei der Amylase auf eine Störung der Kochsalzaktivierung durch Phosphate hingewiesen, eine Wirkung, für welche Bang die Bildung inaktiver Amylasephosphatkomplexe verantwortlich macht. Die von Frieda Orkin⁶⁾ beobachtete Vermehrung der Leberamylase bei Urannephritis könnte dann wohl mit einer Vermehrung von freier Amylase gegenüber solchen inaktiven Komplexen infolge Verminderung des Phosphatgehaltes in Zusammenhang stehen.

Nicht minder widersprechend lauten die auf die Schwermetallsalze bezüglichen Angaben. Effront⁷⁾ betrachtet die Vanadinsalze, das Aluminiumazetat und eine Reihe von Schwermetallsalzen als förderlich für die Diastasewirkung; ebenso erwähnen Gigon und Rosenberg⁸⁾ für Eisen- und Mangansalze eine beträchtliche Förderung des Einflusses der Speichelamylase. Kjeldahl⁹⁾ und Lintner¹⁰⁾ geben demgegenüber an, daß insbesondere Eisen-, Zink- und Bleisalze eine ausgesprochen schädigende Wirkung gegenüber pflanzlicher Diastase entfalten, und Hata¹¹⁾ erwähnt eine mit der Eliminierung des Quecksilbers erlöschende Hemmungswirkung von Quecksilbersalzen.

¹⁾ Wenigstens haben Windisch u. Boden, Wochenschr. f. Brauerei **21** (1904) Nr. 49—53; Bakt. Zentralbl. **3** (1892), sowie Schneidewind, D. Meyer u. Münter, Landwirtsch. Jahrbücher **35** (1906) 911, eine Hemmungswirkung für Gips und Aluminiumsulfat nachgewiesen.

²⁾ Roger, Soc. Biol. **65** (1908) 374.

³⁾ Ueber die schädigende Wirkung des Urans siehe auch Chittenden u. Hutchinson, Stud. Physiol. Lab. of the Yale Univers. **2**, 55.

⁴⁾ Bang, Biochem. Zeitschr. **32** (1911) 417.

⁵⁾ Lisbonne, Soc. Biol. **70** (1911) 207.

⁶⁾ Frieda Orkin, Zeitschr. f. klin. Med. **74** (1912) 433.

⁷⁾ Effront, Die Diastasen 1900, S. 126; Compt. rend. Soc. Biol. **57** (1904) 234; Allg. Brauer- u. Hopfen-Ztg. **45**, 1905.

⁸⁾ Gigon u. Rosenberg, Skand. Arch. Physiol. **20** (1908) 423.

⁹⁾ Kjeldahl, Zeitschr. f. ges. Brauwesen **3** (1880) 186.

¹⁰⁾ Lintner, Journ. f. prakt. Chem. [N. F.] **34** (1886) II. 378, 36 (1887) 481.

¹¹⁾ Hata, Biochem. Zeitschr. **17** (1909) 156.

Was die Metalle selber anbetrifft, so hat Wohlgemuth (loc. cit.) kolloides Gold, Silber, Kupfer und Eisen geprüft und eine Förderung in geringeren, eine Schädigung in großen Quantitäten festgestellt. Es besteht also, wie wohl für alle übrigen Stoffe, ein Wirkungsoptimum für eine bestimmte Konzentration. Wird dasselbe überschritten, so schlägt der fördernde Einfluß in einen hemmenden um. Die Hemmung soll nach Gerber¹⁾ auf einer Beeinflussung der Stärke beruhen, doch dürfte jedenfalls die Wirkung auf das kolloide Ferment nicht außer acht gelassen werden. Von sonstigen Stoffen, die auf ihre aktivierende oder hemmende Wirkung hin untersucht wurden, sind Antiseptika²⁾, Antipyretika³⁾, Narkotika⁴⁾, Mydriatika⁵⁾, wurmtreibende Mittel⁶⁾, Krampfgifte⁷⁾ und zahlreiche andersartig wirkende Alkaloide⁸⁾ und sonstige Gifte⁹⁾, sowie die Radiumemanation¹⁰⁾ zu nennen, die teils fördernd, teils hemmend, teils, je nach der Konzentration, fördernd oder hemmend, teils überhaupt nicht einwirken¹¹⁾. Endlich wird die Wirkung der Diastase gehemmt durch einen spezifischen, bei

¹⁾ Gerber, Soc. Biol. 70 (1911) 189, 547, 724, 727.

²⁾ Hemmend wirken Alkohol [Watson, Journ. Chem. Soc. 35 (1879) 539], Salizylsäure [Julius Müller, Journ. f. prakt. Chem. [N. F.] 10 (1874) 444], Thy-mol [Schlesinger, Virchows Arch. 125 (1891) 146] und Wasserstoffperoxyd [Wal-bum, Berl. klin. Wochenschr. 48 (1911) 1929; Gerber, Compt. rend. 154 (1912) 1543; Soc. Biol. 72 (1912) 946, 1002; W. Löb, Biochem. Zeitschr. 46 (1912) 125]; Formaldehyd soll dagegen in 2—5%iger Lösung die Diastase aktivieren [Somló u. Lászlóffy, Oesterr. Chem.-Ztg. 7 (1904) 126]. Doch dürfte für diese von Fodor bestrittene Beobachtung die von der Autorin festgestellte und von H. Maggi, loc. cit., eingehend studierte, der Diastase in vieler Hinsicht analoge Einwirkung des Formaldehyds auf Stärke verantwortlich zu machen sein.

³⁾ Antipyrin besitzt keinerlei Einfluß, Chinin dagegen hemmt schwach; Goebel, Dissert., Petersburg 1905.

⁴⁾ Chloroform, Paraldehyd [Chittenden u. Stewart, Malys Jahrb. 20 (1890) 248] und Kodein hemmen, Morphin (Goebel, loc. cit. vorige Fußnote) beschleunigt. Vgl. demgegenüber Gerber, Soc. Biol. 71 (1911) 208.

⁵⁾ Salzsäures Atropin beschleunigt nach Goebel, loc. cit., nach Detmer. Landwirtsch. Jahrbücher 10 (1881) 757, soll es hemmen.

⁶⁾ Pilokarpin fördert [Goebel, loc. cit.; Picciolo, Arch. Ital. Biol. 50 (1908) 282].

⁷⁾ Strychnin ist wirkungslos [Kjeldahl, Zeitschr. f. ges. Brauwesen 3 (1880) 186].

⁸⁾ Siehe z. B. Bywaters u. Waller, Journ. Physiol. 40 (1910) 45.

⁹⁾ Chittenden u. H. E. Smith, sowie Chittenden u. Painter, Malys Jahrb. 15 (1885) 256.

¹⁰⁾ Löwenthal u. Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 21 (1909) 476.

¹¹⁾ Siehe Nasse, Pflügers Archiv 11 (1875) 145; Chittenden u. Painter, loc. cit. Fußnote 9, diese Seite.

65° beständigen Antikörper, der im Blut von Kaninchen, denen Diastaselösungen eingespritzt worden sind, auftritt¹⁾. Vielleicht könnte es sich hierbei um eine durch die Spaltprodukte bewirkte Umkehrung der Fermentwirkung handeln.

Daß eine Umkehrung der Diastasewirkung vorkommt, dafür sprechen die Beobachtungen von Braun und Heron²⁾, sowie Fernbach u. Wolff³⁾, Wolff⁴⁾, Wolff und Fernbach⁵⁾, die zu der Annahme einer künstlichen Stärkebildung aus den ersten Spaltprodukten (Retrogradation) geführt haben. Die genannten Forscher sind jedoch der Ansicht, daß ein von der Diastase verschiedenes Enzym, die Amylokoagulase, vorliegt; Maquenne und Roux⁶⁾ sowie Lisbonne⁷⁾ sehen demgegenüber einfache Ausscheidungsvorgänge als möglich an, und Reichert⁸⁾ hat wohl eine Reversion (Rückbildung von Stärke aus Erythrodextrin beim Erwärmen), nicht aber eine fermentative Reversion beobachtet, welche letztere auch Wohl und Glimm⁹⁾ zweifelhaft erscheint. Die den Vorstellungen einer Amylokoagulasewirkung zugrunde liegenden Beobachtungen lassen aber noch eine andere Auffassung zu, welche zuerst von Lintner vertreten, später durch Arbeiten von Samec (loc. cit.), Feistmann¹⁰⁾ und Sallinger¹¹⁾ gestützt worden ist. Danach wäre die Ausflockung nicht auf eine Stärkerückbildung zurückzuführen, sondern umgekehrt als eine Begleiterscheinung des Spaltprozesses zu betrachten, vergleichbar etwa der Ausfällung des Kaseins unter dem proteolytischen Einfluß des Labfermentes. Die Koagulation käme nach Lintner dadurch zustande, daß bei der diastatischen Wirkung zunächst die als Schutzkolloide für die Gele wirkenden leichter angreifbaren Sole verzuckert werden. Je kräftiger die Diastase unter den betreffenden Bedingungen wirkt, je weitgehender also in gleichen Zeiten die dem Abbau entsprechende Zunahme des Dispersitätsgrades ist, desto weniger wird das Reaktionsgemisch die betreffenden Koagulationserscheinungen zeigen.

Im Anschluß an ihre schon erwähnten Arbeiten haben H. Maggi und die Verfasserin auch das Formalin auf stärkerückbildende Fähigkeiten geprüft und dabei die Ausscheidung typischer, sphärokristallartiger Bildungen aus Stärkelösungen festgestellt. Wie Kontrollversuche mit Ameisensäure, Kohlensäure und anderen Säuren zeigten, sind jedoch diese für die Wirkung des sauren Formalins

¹⁾ Schütze u. K. Braun, Zeitschr. f. klin. Med. 64 (1907) 509; Zeitschr. f. experim. Pathol. 6 (1909) 308; Preti, Biochem. Zeitschr. 4 (1907) 6; Gessard u. Wolff, Compt. rend. 146 (1908) 414; Ascoli u. Bonfanti, Zeitschr. f. physiol. Chem. 43 (1904) 156.

²⁾ Braun u. Heron, Ann. Chem. 199 (1880) 247.

³⁾ Fernbach u. Wolff, Ann. Inst. Past. 18 (1904) 165.

⁴⁾ Wolff, Wochenschr. f. Brauerei 21 (1904) Nr. 24.

⁵⁾ Wolff u. Fernbach, Compt. rend. 144 (1907) 645.

⁶⁾ Maquenne u. Roux, Bull. Soc. Chim. 33 (1905) 723; Ann. Chim. Phys. [8] 9 (1906) 179.

⁷⁾ Lisbonne, Soc. Biol. 71 (1911) 140.

⁸⁾ Reichert, Univ. Pennsylv. Med. Bull. 23 (1910) 57.

⁹⁾ Wohl u. Glimm, Biochem. Zeitschr. 27 (1910) 349.

¹⁰⁾ Feistmann, Inaug.-Dissert., München 1909.

¹¹⁾ Sallinger, Zeitschr. f. Kolloide 25 (1919) 79.

gegenüber Stärke- und auch Glykogenlösungen verantwortlich zu machen, ein Umstand, der auch für den Stärke- und Glykogenstoffwechsel der Pflanzen bzw. Tiere und seine Anomalien (Diabetes mellitus des tierischen Organismus) von Bedeutung sein dürfte.

Den stofflichen Beeinflussungen der diastatischen Enzyme sind die Hemmungen und Förderungen durch Strahlungen anzureihen. Der ganze ultraviolette Spektralteil schädigt nach Green (loc. cit.) und Chauchard¹⁾ die Diastase, ebenso schädigt das sichtbare Spektrum Blau, Orange und Rot, jedoch erst nach einer vorausgegangenen, wahrscheinlich durch eine Umwandlung von Diastasezymogen in wirksames Ferment bedingten Förderung²⁾.

Was den Einfluß des Ultrarotes betrifft, so hat Müller-Thurgau³⁾ bei der Diastase die nämlichen Wirkungen einer Temperaturerhöhung festgestellt, denen die Enzyme ganz allgemein unterliegen⁴⁾. Das Temperaturoptimum wurde von Kjeldahl mittels des Reduktionsvermögens der Spaltprodukte zu 63° bestimmt. Doch hängt dasselbe wie auch die Tötungstemperatur⁵⁾ weitgehend von der Herkunft der Diastase und damit von den in dem betreffenden Material vorhandenen Begleitstoffen ab, so daß z. B. für Pankreasamylase ein so niedriger Wert wie 36–40°, für Speichelamylase ein solcher von 46° für das Temperaturoptimum gefunden werden konnte⁶⁾. Es ist auch nicht einerlei, ob bei der Feststellung der Optimal- und Tötungstemperaturen auf die stärkeverflüssigende Wirkung oder auf die verzuckernde Wirkung abgestellt wird, was zugunsten der erwähnten Zweienzymtheorie herangezogen worden ist. Würde der von Kjeldahl

¹⁾ Chauchard u. Mazonne, *Compt. rend.* 152 (1911) 1709.

²⁾ Die geringste Zerstörung zeigt die Diastase des Blätterextraktes, da nach Green, *Phil. Transact.* 188 (1897) 167, das Chlorophyll schützt.

³⁾ Müller-Thurgau, *Landwirtsch. Jahrbücher* 14 (1885) 795.

⁴⁾ Siehe auch Kendall u. Sherman, *Journ. Amer. Chem. Soc.* 32 (1910) 1087.

⁵⁾ Klemperer, *Biochem. Zeitschr.* 10 (1908) 204, fand für Haferdiastase die Tötungstemperatur von 90°. Siehe auch die Angabe von Pavy, *Journ. Physiol.* 22 (1898) 391, daß kochender absoluter Alkohol nicht zerstörend wirkt, und diejenige von Gramenitzki, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 69 (1910) 286, daß Takadiastase selbst durch Temperaturen von 115° nur entaktiviert, aber nicht zerstört wird, und je nach der Eigenart des Diastasepräparates mit oder ohne ihr Substrat (am energischsten — aber nach 4–6 Stunden erlahmend — bei 40°, langsamer, jedoch vollständig, bei gewöhnlicher Temperatur) ihre Wirkung wiedererlangt. Slosse u. Limbosch, *Arch. di Fisiol.* 7 (1909) 100, haben als Inaktivierungstemperatur 75° angegeben.

⁶⁾ Chittenden u. Martin, *Malys Jahrb.* 15 (1885) 263; Evans, *Journ. Physiol.* 44 (1912) 191.

gefundene hohe Wert für das Optimum der Stärkeverflüssigung entsprechen, so wäre dies in Uebereinstimmung mit den Befunden von Wohl und Glimm¹⁾, nach welchen sich die Stärkeverflüssigung als in viel höherem Maße durch das spezifische Substrat, die Stärke, schützbar erweist²⁾ als die statt dessen durch Maltose konservierend beeinflusste verzuckernde Wirkung³⁾. Da auch Dextrin und Glukose die Tötungstemperatur erhöhen, aber nur um halb so viel wie die Stärke, so muß während der diastatischen Stärkespaltung selbst das Temperaturmaximum Schwankungen unterworfen sein.

Auch gegenüber Wechselströmen besteht ein Optimum. Wie Lebedew⁴⁾ gefunden hat, wirken dieselben bei einer Stärke von 0,015 Ampère günstig, während stärkere Wechselströme wie auch Gleichströme schädigen. Wandert die Diastase selbst im Stromgefäll (zur Kathode), so erfährt sie dabei ebenfalls nach Lisbonne und Vulquin⁵⁾ eine Inaktivierung. Erwähnt sei ferner, daß unter dem Einfluß des Solenoids Goflin⁶⁾ bei 2—4 Volt eine Begünstigung des diastatischen Saccharifikationsprozesses feststellte. Endlich sei auch die von Harlow und Stiles⁷⁾ beobachtete partielle Inaktivierung der Amylase durch Schütteln angeführt, die hier wie bei anderen physikalischen und manchen chemischen Einflüssen ihre Ursache in Variationen der kolloidalen Beschaffenheit der Fermente besitzt.

Die Diastaseermittlung.

Nach dem soeben Ausgeführten ist es ohne weiteres klar, daß von einer exakten Ermittlung des Diastasegehaltes eines pflanzlichen oder tierischen Saftes nicht gesprochen werden kann, solange dessen Zusammensetzung nicht bis in die feinsten Details bekannt ist und solange nicht die Wirkungen aller in dem betreffenden Saft vorhandenen Stoffe auf die Diastase einzeln und im Gemisch eingehend studiert sind. Ob man jemals zu einer solchen Kenntnis gelangen

¹⁾ Wohl u. Glimm, *Biochem. Zeitschr.* 27 (1910) 349.

²⁾ Nach Chrzaszcz u. Pierozek, *Zeitschr. f. Spiritusind.* 33 (1910) 66, liegt die Tötungstemperatur in Gegenwart von Stärke um 10° höher als ohne dieses Substrat.

³⁾ Allerdings hat van Laer, *Bull. Soc. Chim. de Belgique* 26 (1912) 18, nur eine geringe Schutzwirkung der Maltose beobachtet.

⁴⁾ Lebedew, *Biochem. Zeitschr.* 9 (1908) 392.

⁵⁾ Lisbonne u. Vulquin, *Soc. Biol.* 72 (1912) 936.

⁶⁾ Goflin, *Biochem. Zeitschr.* 12 (1908) 1706; Inaug.-Dissert., Zürich 1911.

⁷⁾ Harlow u. Stiles, *Journ. Biol. Chem.* 6 (1909) 359.

wird, erscheint fraglich. Jedenfalls sind wir zur Stunde noch sehr weit von diesem Punkt entfernt, und es ist daher auch nicht wunderbar, daß wir über die einfachsten Gesetze der Diastasewirkung noch im unklaren sind.

Wenn man aber auch nach dem Vorausgeschickten von einer Bestimmung des tatsächlichen Diastasegehaltes abstrahieren muß, so läßt sich doch wenigstens ein Maß für die Stärkespaltungsfähigkeit irgendeines diastasehaltigen Materials gewinnen, und dies ist praktisch von ebenso großem oder größerem Wert wie die genaue Kenntnis des Diastasegehaltes selbst, um so mehr als die Wirkungen der Fermente ja das einzig Sichere sind, das man von diesen Stoffen kennt. Ob diese Wirkung durch einen einheitlichen Körper oder durch die Summe irgendwelcher in bestimmter Weise zusammenwirkender Faktoren bedingt wird, ist im Grunde einerlei.

Diastasebestimmung durch Ermittlung des gebildeten Zuckers.

a) Die Reduktionsverfahren.

Die ersten Vorstöße zur Bestimmung des diastatischen Einflusses verdanken wir Musculus¹⁾, Payen²⁾ und Schwarzer³⁾. Sie ermittelten ebenso wie später O'Sullivan⁴⁾ und Baranetzki⁵⁾ die Menge der unter dem Einfluß des diastatischen Materials gebildeten Maltose. Lintner⁶⁾ wiederum mißt das Reduktionsvermögen des Reaktionsgemisches nach der Einwirkung der Diastase, indem er auf je 10 ccm einer 2%igen Stärkelösung verschiedene Quantitäten der betreffenden Diastaselösung einwirken läßt und feststellt, welche Menge zur Reduktion von 5 ccm Fehlingscher Lösung gerade ausreichend ist⁷⁾.

¹⁾ Musculus, Ann. Chim. Phys. [3] 60 (1860) 208.

²⁾ Payen, Ann. Chim. Phys. [4] 4 (1865) 286, 7 (1866) 382.

³⁾ Schwarzer, Journ. f. prakt. Chem. [N. F.] 1 (1870) 212.

⁴⁾ O'Sullivan, Journ. Chem. Soc. London 30 (1876) II, 125.

⁵⁾ Baranetzki, Die stärkeumbildenden Fermente in den Pflanzen, Leipzig 1878, S. 10.

⁶⁾ Lintner, Journ. f. prakt. Chem. [N. F.] 34 (1886) II, 378, 36 (1887) 481; Lintner u. Ch. Wirth, Zeitschr. f. ges. Brauwesen 31, II (1908) 421.

⁷⁾ Die willkürlich gewählte Einheit der diastatischen Kraft ($F = 100$) besitzt nach Lintner eine Diastase, von der 0,03 ccm einer Lösung von 0,1:250,0 (0,12 mg) in einer Stunde bei 20° die zur Reduktion der 5 ccm Fehlingschen Lösung erforderliche Menge Zucker bilden. Ein diastasehaltiges Material, von dem 0,6 mg (also fünfmal so viel) verwendet werden müssen, um die nämliche

Die Ausführung der für die Untersuchung von Malzauszügen ausgearbeiteten Methode geschieht in der Weise, daß man zu zehn Reagenzgläsern, welche von 0,1—1 ccm aufsteigende Mengen des aus 25 g Malzschrot durch 6stündige Extraktion mittels 500 ccm Wasser gewonnenen, klaren Auszugs enthalten, je 10 ccm der Stärkelösung und 5 ccm der Fehlingschen Lösung setzt, umschüttelt und die Gläser 10 Minuten lang in ein kochendes Wasserbad setzt. Wo die Diastasemenge nicht ausreichend war, um zur Reduktion der 5 ccm Fehlingschen Lösung hinreichende Mengen reduzierenden Zuckers oder Dextrine zu bilden, ist die blaue Farbe erhalten geblieben, und wo ein Ueberschuß an reduzierenden Stoffen im Reaktionsgemisch vorhanden ist, wird die Färbung gelb. Ist ein farbloses Gläschen vorhanden, so bezeichnet dessen Diastasegehalt den gesuchten Grenzwert, andernfalls wird das Mittel der Diastasemengen des letzten blauen und des ersten gelben Gläschens genommen.

Sherman, Kendall und Clark¹⁾ verfahren bei ihrer Bestimmungsmethode in ganz analoger Weise, nur arbeiten sie mit 100 ccm Stärkelösung und bestimmen das ausgeschiedene Kupfer. Als Versuchstemperatur verwenden sie 40° C. Auf der Bestimmung des Reduktionsvermögens basieren auch die von Sykes und Mitchell²⁾ sowie von Wróblewski³⁾ angegebenen Verfahren⁴⁾. Ferner hat

Wirkung zu erzielen. hätte dementsprechend die fermentative Kraft $F = 20$. Nach den Angaben von Wohlgemuth, Grundriß usw., loc. cit. S. 84, würde ein Malzauszug das diastatische Vermögen $F = 100$ besitzen, wenn 0,1 ccm desselben die zur Reduktion der 5 ccm Fehlingscher Lösung erforderliche Menge Zucker bilden. Sind 0,4 ccm angewendet worden, so würde demnach die „diastatische Kraft“ $F = \frac{100}{4} = 25$ betragen bzw. auf die Malztrockensubstanz be-

rechnet: $\frac{25 \cdot 100}{n}$, wenn n die Anzahl Prozente an Trockensubstanz bedeuten.

¹⁾ Sherman, Kendall u. Clark, Journ. Amer. Chem. Soc. 32 (1910) 1073.

²⁾ Sykes u. Mitchell, The Analyst 21 (1896) 122.

³⁾ Wróblewski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 24 (1898) 173; Ber. d. chem. Ges. 31 (1898) 1130.

⁴⁾ Wróblewski verfährt in der Weise, daß er 2 g der nach seiner eigenen Vorschrift hergestellten, völlig reinen löslichen Stärke mit 20 ccm heißem Wasser versetzt und hierauf, unter beständigem Zerreiben, allmählich in kleinen Portionen weiter heißes Wasser zugibt, bis eine homogene dicke Masse entsteht. Nachdem dieselbe in ein Becherglas gespült und gekocht worden ist, bis eine dünne Lösung resultiert, läßt sie Wróblewski erkalten und bringt sie auf 100 ccm. Von dem auf seinen Diastasegehalt zu prüfenden, bei 60° getrockneten Material werden 0,01 g in 10 ccm Wasser gelöst und mit 50 ccm der vorbereiteten Stärke-

Wohlgemuth¹⁾ die folgende Reduktionsmethode angeführt. Er bedient sich einer 2%igen Stärkelösung, die aus gewöhnlicher Kartoffelstärke hergestellt wird, und versetzt 10 ccm derselben mit 0,5—1 ccm Speichel oder einem andern diastaseführenden Material und überläßt die Probe während einer Stunde einer Temperatur von 38°. Danach wird mit ein paar Tropfen 10%iger Essigsäure angesäuert, einige Körnchen Kochsalz zugesetzt und die Lösung aufgeköcht. Das ausgefällte Eiweiß wird darauf abfiltriert, das Filter mit heißem Wasser nachgewaschen und das zuckerhaltige Filtrat auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt, worauf man den gebildeten Zucker in einem aliquoten Teil nach einem der gebräuchlichen Verfahren bestimmt.

Wohlgemuth empfiehlt zu diesem Zweck das Titrationsverfahren von Bang²⁾, nach welchem eine Kupferlösung verwendet wird, die im Liter 250 g Kaliumkarbonat, 200 g Kaliumrhodanid, 50 g Kaliumbikarbonat, + 12½ g nach Soxhlet gereinigtes Kupfersulfat enthält. Ueber die Details der Herstellung siehe die Originalarbeit oder Wohlgemuth³⁾. 50 ccm der Kupferlösung werden hierauf mit 10 ccm der zu bestimmenden Zuckerlösung in einem 200-ccm-Kolben bis zum Kochen erhitzt und 3 Minuten im Sieden belassen. Hierauf wird rasch abgekühlt und mit einer Hydroxylaminlösung⁴⁾, die im Liter 3,275 g reines Hydroxylaminsulfat und 100 g Rhodankalium enthält, bis zum Verschwinden der blauen Farbe des überschüssigen Kuprikupfers titriert (die Hydroxylaminlösung ist so konzentriert, daß 1 ccm derselben 1 ccm der Kupferlösung entspricht). Die Berechnung ergibt sich aus der folgenden Tabelle (siehe S. 99).

Auf demselben Prinzip beruht auch das Maß für die Güte eines Pankreatinpräparates, welches die französische Pharmakopöekommission⁵⁾ vorgeschlagen hat. Danach sollen 0,2 g Pankreatin, in 25 g Wasser gelöst, 100 g 5%igen Stärkekleister so vollkommen saccharifizieren, daß das von ihm ablaufende Filtrat sein vierfaches Volumen Fehlingscher Lösung entfärbt.

Indirekt kommt die verzuckernde Wirkung der Diastase auf die

lösung im verschlossenen Kölbchen vermischt. Nachdem die Lösung 8 Stunden im Thermostaten bei 40° sich selbst überlassen wurde, wird die weitere Diastasewirkung durch Aufkochen unterbrochen, das Gemisch filtriert, nach dem Herstellen des ursprünglichen Volumens in 20 ccm des Filtrates der Zucker mittelst Fehlingscher Lösung bestimmt und auf Maltose berechnet.

¹⁾ Wohlgemuth, Grundriß der Fermentmethoden, Berlin 1913, S. 31.

²⁾ Bang, Biochem. Zeitschr. 2 (1907) 271, 11 (1908) 538, 32 (1911) 443.

³⁾ Wohlgemuth, loc. cit. S. 32.

⁴⁾ An Stelle des Hydroxylamins wurde von Bang, Biochem. Zeitschr. 49 (1913) 1, Kaliumhydroxyd empfohlen.

⁵⁾ Pharm.-Ztg. 27 (1882) 706; New Remedies 11, 193; zitiert nach Zeitschrift f. anal. Chem. 22 (1883) 294.

Verbrauchte Kubikzenti- meter Hydr- oxylamin- lösung entsprechen	Milligramm Zucker	Verbrauchte Kubikzenti- meter Hydr- oxylamin- lösung entsprechen	Milligramm Zucker	Verbrauchte Kubikzenti- meter Hydr- oxylamin- lösung entsprechen	Milligramm Zucker
1,0	59,4	15,0	36,4	30,0	18,6
2,0	56,3	16,0	35,1	31,0	17,5
3,0	55,0	17,0	33,9	32,0	16,5
4,0	53,4	18,0	32,6	33,0	15,4
5,0	51,6	19,0	31,4	34,0	14,4
6,0	49,8	20,0	30,2	35,0	13,4
7,0	48,0	21,0	29,0	36,0	12,4
8,0	46,3	22,0	27,7	37,0	11,4
9,0	44,7	23,0	26,5	38,0	10,4
10,0	43,3	24,0	25,2	39,0	9,4
11,0	41,8	25,0	24,1	40,0	8,5
12,0	40,4	26,0	22,9	41,0	7,6
13,0	39,0	27,0	21,8	42,0	6,7
14,0	37,7	28,0	20,7	43,0	5,8
—	—	29,0	19,6	44,0	4,9

Stärke auch in Betracht bei der Methode, welche Gawalowski¹⁾ zur Bestimmung des Extraktgehaltes im Darrmalz ausgearbeitet hat.

b) Die Moore-Hellersche Reaktion in ihrer Anwendung auf die Stärkebestimmung.

Den erwähnten Methoden, welche alle auf eine Verfolgung der Stärkespaltung auf Grund der gebildeten Reaktionsprodukte hinauslaufen, läßt sich außer einer von König²⁾ angeführten, aber nicht besonders empfohlenen Methode zur Bestimmung der Stärke in Futtermitteln das kolorimetrische Verfahren von Kübel³⁾ anreihen, bei welchem unter Zugrundelegung des Prinzips der Moore-Hellerschen Zuckerprobe⁴⁾ die durch Natronlauge bewirkte Gelbfärbung des entstandenen Zuckers an Hand des Vergleichs mit einer Kaliumchromatlösung gemessen wird. An Stelle dieser namentlich für stärkere Zuckerkonzentrationen wegen der Nuancendifferenzen nicht gerade geeigneten Testlösung versuchten die Verfasserin und H. Maggi⁵⁾, eine Anzahl Mal-

¹⁾ Gawalowski, Zeitschr. f. anal. Chem. 40 (1901) 641.

²⁾ König, Die Untersuchung landwirtsch. und gewerblich wichtiger Stoffe, Berlin 1891, S. 233.

³⁾ Kübel, Pflügers Archiv 76 (1898) 276.

⁴⁾ loc. cit. im Kapitel: Katalyse durch Hydroxylionen von Bd. 2 der Katalyse, 1. Abteilung des *Spez. Teils*.

⁵⁾ Siehe auch H. Maggi, Fermentforschung 2 (1919) 330—337; G. Woker, Ber. d. chem. Ges. 49 (1916) 2314.

toselösungen verschiedener Konzentration zu verwenden, von denen je 10 ccm mit 5 ccm einer 20%igen NatronlaugeLösung versetzt, mit je 10 ccm der (auf die Menge der in ihnen zur Wirkung gelangten Diastase zu prüfenden) Stärkespaltungsgemische + 5 ccm Alkali derselben Konzentration gleichzeitig der Temperatur eines siedenden Wasserbades ausgesetzt werden. Die Maltosekonzentration eines Spaltungsgemisches wäre bestimmt, sobald das betreffende Gläschen den nämlichen Grad von Braunfärbung aufweist, wie eine der Vergleichslösungen bekannter Konzentration. Wird der Punkt der Farbengleichheit nicht getroffen, so wird eine neue Serie mit Vergleichslösungen in dem in Frage kommenden Konzentrationsgebiet angesetzt, bis die dem Diastasegehalt der Probe entsprechende Maltosekonzentration aufgefunden ist. Die rasche Veränderung dieser Testlösungen und die Abhängigkeit der Verfärbungsgeschwindigkeit von den Begleitstoffen in den Reaktionsgemischen bilden jedoch nicht zu unterschätzende Fehlerquellen beim Arbeiten nach diesem Verfahren.

Diastasebestimmung durch Ermittlung des Verschwindens der Stärke.

Den im vorigen genannten Methoden gegenüber stehen jene, die den Nachweis des Verschwindens der Stärke oder des Glykogens zum Gegenstand haben.

a) Die Stärkeverflüssigung.

Eines einfachen Mittels, dessen Brauchbarkeit zur quantitativen Diastasebestimmung jedoch noch nicht erwiesen ist, bedient sich Pawlows Schüler Walther¹⁾, indem er, wie bei der Mettschen Pepsinbestimmungsmethode, die Wirksamkeit der Diastase aus der durch dieses Ferment bewirkten Verkürzung eines Stärkekleisterzylinders ermittelt.

An Stelle dieser Methode, bei der sich die nämlichen Fehlerquellen geltend machen müssen, wie sie bei dem Verfahren der Pepsinbestimmung nach Mett eingehend erläutert sind, hat Müller²⁾ zur Schätzung der diastatischen Wirkung eine Stärkekleisterplatte benutzt und die Verdünnung bestimmt, die man einer auf ihren diastatischen Wirkungswert zu prüfenden Flüssigkeit geben muß,

¹⁾ Walther, nach Pawlow, Arb. d. Verdauungsdrüsen, Wiesbaden 1903.

²⁾ Müller, Die Stärkekleisterplatte usw., Kongreß f. innere Med., 1908, S. 386; Schaumberg, Diastatische Fermente im Urin, Dissert., Marburg 1910.

damit die durch die Stärkelösung veranlaßte Dellenbildung auf der Platte gerade eben ausbleibt. Die gefundenen Grenzwerte für die Verdünnung erscheinen geeignet, diastaseführende Materialien unter sich und mit einer Diastasetestlösung von bekanntem Wirkungswert zu vergleichen.

Wie bei den beiden erwähnten Methoden von Walther und Müller nur die mit der Lösung verbundene erste Phase der Stärkespaltung zur Messung gelangt, so ist dies auch der Fall bei dem Verfahren, welches von Pollak¹⁾ und nach ihm von Chrzaszcz und Pierozek²⁾ empfohlen worden ist. Danach wird die Minimalmenge einer Diastaselösung aufgesucht, die 0,3 g Stärke³⁾ in Form eines 3%igen Kleisters in 30 Minuten bei einer Temperatur von 37,6° vollständig zu verflüssigen⁴⁾ vermag. Beim Malz wird ein 2%iger Auszug verwendet und das Verflüssigungsvermögen auf 1 g Malz umgerechnet entsprechend der Proportion: $n:0,3 = x:1$, worin n die in der verwendeten Flüssigkeitsmenge enthaltene Malzquantität bedeutet.

Ferner könnte das Verflüssigungsvermögen einer Diastaselösung auch indirekt bestimmt werden z. B. durch die Feststellung der Viskositätsabnahme bei der Verflüssigung von Stärkekleister. Diese Methode⁵⁾ hat jedoch mit der von Fernbach und Wolff⁶⁾ für die Praxis der Diastasebestimmung sehr wichtigen Feststellung der Beeinflußbarkeit der Viskosität durch die in der Stärke selbst enthaltenen sauren und basischen Salze, insbesondere Kalksalze sowie Zusätze solcher Salze, zu rechnen.

Bei Anwendung irgend einer der genannten Methoden, die auf der Stärkeverflüssigung basieren, ist es notwendig, sich zu vergegenwärtigen, daß nur jener Teileffekt der Diastase zur Messung gelangt, der der ersten Spaltungsphase entspricht. Schlüsse von diesem Teileffekt auf die Gesamtwirkung der Amylase zu ziehen ist keinesfalls zulässig, selbst wenn man nicht aus den weitgehenden Unterschieden in den Resultaten, die bei den Stärkeverflüssigungsverfahren bzw. den

¹⁾ Pollak, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 6 (1908) 729; Wochenschr. f. Brauerei (1908) 595.

²⁾ Chrzaszcz u. Pierozek, Zeitschr. f. Spirit.-Ind. 33 (1910) 66; Chrzaszcz, Ebenda 32 (1909) 535; siehe ferner Effront-Bücheler, Die Diastasen, 1900; Lintner u. Sollied, Zeitschr. f. ges. Brauwesen 26 (1908) 329.

³⁾ Reinste Arrow-Rootstärke von bekanntem Aschen- und Wassergehalt.

⁴⁾ Als Kriterium der vollständigen Verflüssigung dient die gleichmäßige Rotfärbung der ganzen Lösung durch einige Tropfen Phenolphthalein.

⁵⁾ H. Maggi, Fermentforschung 2 (1919) 355 ff.

⁶⁾ Fernbach u. Wolff, Compt. rend. 140 (1905) 1403.

auf das Verschwinden der Jodstärkereaktion abstellenden Methoden und denjenigen der Stärkeverzuckerung¹⁾ erhalten werden, eine Stütze für die Zweienzymtheorie konstruieren will²⁾).

b) Verfahren, die sich zur Ermittlung des Diastasegehaltes von Fermentpräparaten auf das Verschwinden oder die Aenderung der Jodstärkereaktion gründen.

Erprobter als die auf der Stärkeverflüssigung basierenden Verfahren sind diejenigen, welche auf das Verschwinden der blauen Jodreaktion der Stärke abstellen. Grundlegend ist hier die Methode von Dunstan und Dimmock³⁾ geworden.

Danach werden in zwei Flaschen je 0,1 g Stärke in 100 cem heißem Wasser gelöst und zu der einen Lösung 10 cem einer 10%igen Malzextraktlösung, zu der anderen 20 cem der nämlichen Malzextraktlösung gesetzt. Nachdem man beide Gemische bei 35–40° C 3 Stunden sich selbst überlassen hat, werden sie an wenigen herausgenommenen Tropfen mit Jodjodkaliumlösung geprüft. Ist in der mit 20 cem Malzextrakt versetzten Stärkeprobe die Stärke verschwunden, während sie in der mit 10 cem versetzten noch nachzuweisen ist, so wird der Versuch mit zwischen 10 und 20 cem liegenden Mengen wiederholt.

Hager⁴⁾ sowie Cripps⁵⁾ haben diese Methode zur Feststellung des für die Wirkung auf die Verdauung besonders wichtigen Diastasegehaltes des Malzextrakts empfohlen⁶⁾. Die Angaben über den diastatischen Wert des Malzextrakts werden von verschiedenen Autoren ganz ungleich angegeben, was Cripps auf die verschiedene Bereitung der Stärkelösung zurückführen will.

Hager gibt an, daß 100 Teile Malzextrakt wenigstens 10 Teile Stärkemehl während 5stündiger Digestion bei 50–60° zu verzuckern vermögen. Auch betrachtet er als Kriterium für das echte Malzextrakt, daß es auch nach der genauen Neutralisation mit Kalziumkarbonat oder Magnesiumkarbonat wirksam ist. Cripps seinerseits stellt an gutes Malzextrakt die Forderung, daß es bei 55° in 10–15 Minuten mindestens sein gleiches Gewicht Kartoffelstärke verzuckere. Ist nach 30 Minuten noch Stärke nachweisbar, so ist das betreffende Malzextrakt als Medikament unbrauchbar. Diastase selbst vermag ihr 2000faches Gewicht an Stärkemehl zu verzuckern.

¹⁾ Lang, Zeitschr. f. exp. Pathol. 8 (1910) 279.

²⁾ Siehe im vorigen.

³⁾ Dunstan u. Dimmock, Archiv d. Pharm. [2] (1879) 468.

⁴⁾ Hager, Pharm. Zentrallh. 22 (1881) 368.

⁵⁾ Cripps, Pharm. Journ. and Transact. (1889) 481, gibt eine besondere Vorschrift, die jedoch die Methode von Dunstan u. Dimmock zur Grundlage hat.

⁶⁾ Vgl. auch die ähnlichen Vorschriften von Roberts, Proc. Roy. Soc. 32 (1881) 145; Detmer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 7 (1882) 1, und neuerdings von Johnson, Journ. Amer. Chem. Soc. 30 (1908) 798.

Die nämlichen Prinzipien wie für die Untersuchung des Malz-extrakts gelten auch für die Prüfung des Pankreatins auf seine Brauchbarkeit, indem die Geschwindigkeit der Stärkespaltung und die maximal in Gegenwart einer bestimmten Quantität des Präparates verzuckerbare Stärkemenge ein Maß sind für dessen Güte. Schüttelt man nach der Vorschrift von Moriarta¹⁾ im Reagenzglas 0,12 g des Präparates mit 5,32 ccm Wasser, fügt 7 Tropfen Stärkekleister²⁾ hinzu, schüttelt wieder und versetzt rasch mit einem Tropfen Jodtinktur, so soll die Blaufärbung verschwunden sein, wenn das Pankreatin gut ist.

Um den Wirkungswert irgendwelcher Diastase enthaltenden Materialien zu ermitteln, eignet sich ferner das auf dem nämlichen Prinzip wie die vorigen Methoden basierende kolorimetrische Verfahren von Jokichi Takamine³⁾, der das zu untersuchende Material mit Takadiastase⁴⁾ vergleicht, deren enzymatischer Einfluß konstant sein soll.

Die von diesem Forscher benutzten Lösungen sind: Die Normaltakadiastaselösung, die frisch hergestellt wird durch Vermischen von 1 g der normalen Takadiastase mit 100 ccm Wasser. Eine 5%ige Stärkelösung, hergestellt durch Eingießen einer Mischung von 50 g neutraler Kartoffelstärke und 200 ccm kaltem Wasser in 800 ccm siedendes Wasser. Eine Jodlösung: 1 g Jod und 2 g Jodkalium, in 5 ccm Wasser gelöst, werden auf 120 ccm verdünnt. Nach Jokichi Takamines Vorschrift werden nun acht Gläser von 150 ccm Inhalt mit je 100 ccm der Stärkelösung beschickt und nebeneinander in eine mit Wasser von 40° gefüllte Schale gestellt. Nun wird ein Glas mit 1 ccm des auf seinen Diastasegehalt zu prüfenden Materials, ein weiteres mit 1 ccm der Takadiastaselösung und die übrigen Gläser mit je 1 ccm mehr der letzteren Lösung beschickt. Dann wird aus jedem Glas ein Tropfen herausgenommen, mit einem Tropfen Jodlösung versetzt und bis zur Größe eines Fünfmärkstüekes verrieben. Hierauf wird die Farbe des aus der zu untersuchenden Lösung herausgenommenen Tropfens mit derjenigen der anderen Tropfen verglichen.

Während bei den angeführten Methoden auf den von Roberts als „achromischen Punkt“ bezeichneten Zustand, bei dem auch die Erythrodextrinreaktion verschwunden ist, abgestellt wird⁵⁾, ist eine

¹⁾ Moriarta, Thesis presented to the College of Pharmacy of the City of New York 1882.

²⁾ 0,06 g Stärke in 100 ccm Wasser.

³⁾ Jokichi Takamine, Amer. Journ. Pharm. 70, 141.

⁴⁾ Ueber Takadiastase siehe Fußnote 3, S. 128.

⁵⁾ Nach Evans, Journ. Physiol. 44 (1912) 219, sollen die Methoden, bei denen der „achromische Punkt“ aufgesucht wird, genauer sein als die im folgenden angeführte, die nur auf das Verschwinden der blauen Jodreaktion abgestellt. Doch dürften auch hier die beiden Verfahren gar nicht direkt miteinander vergleichbar sein, da sie nur teilweise in die nämliche Spaltungsphase fallen. Zudem kann man nach der Wohlgemuthschen Methode außer den Gläsern, die die Produkte einer unvollständigen Spaltung enthalten, solche aufsuchen, in

kolorimetrische Methode anderer Art diejenige von Wohlgemuth, welcher eine Anzahl mit fallenden Quantitäten¹⁾ der zu prüfenden diastasehaltigen Lösung²⁾ und je 5 ccm einer 1%igen Stärkelösung gefüllte Reagenzgläser³⁾ in einem Wasserbad von 40° 30 Minuten beläßt, hierauf die Wirkung durch Eiswasser unterbricht und jedem Gläschen nach Auffüllen mit Wasser bis zwei Finger breit vom Rand einen Tropfen einer $\frac{1}{10}$ -normalen Jodlösung zusetzt. Man erhält dann in verschiedenen Reagenzgläsern Färbungen, die je nach dem in dem betreffenden Glas vorhandenen Diastasequantum gelb, rotgelb, violett oder blau ausfallen. Die Grenze der Wirksamkeit weist dasjenige Reagenzglas auf, in dem gerade eben die blaue Farbe zum Verschwinden gebracht ist. Der Gehalt desselben an dem Fermentpräparat wird auf 1 ccm umgerechnet und in dem entsprechenden Wert der Stärkekleisterquantität ausgedrückt⁴⁾. Die hier angegebenen Mengenverhältnisse der Reagentien beziehen sich auf Speicheldiastase. Für Diastasen anderer Herkunft hat Wohlgemuth entsprechende zweckmäßige Variationen eingeführt. So werden für das diastasearme Blutserum nur je 2 ccm einer 1%igen Stärkelösung zu je 1 ccm der mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellten Serumverdünnungen gesetzt und nach $\frac{1}{2}$ stündigem Verweilen im Wasserbad von 38° mit $\frac{1}{50}$ normaler Jodlösung versetzt. Zu Vergleichszwecken muß unbedingt größtes Gewicht auf Einhaltung genau gleicher Mengen der zugesetzten Jodlösung und strenge Kontrollierung ihrer Konzentration gelegt werden, da die geringste Aenderung des Jodgehaltes eine Verschiebung des Farbenbildes des Reaktionsgemisches bewirkt. Eine Modifikation der Methode, bei der die mit größeren Stärkequantitäten versetzten Proben 24 Stunden im Brutschrank belassen werden, ist ferner von Wohlgemuth für verschiedene diastasehaltige Materialien angegeben worden, in denen sich die Produkte einer vollständigen Stärkespaltung befinden, in welchem Fall kein Unterschied zwischen den beiden Methoden bestehen würde.

¹⁾ Dieselben repräsentieren z. B. eine geometrische Reihe 1,0, 0,64, 0,4, 0,25, 0,16, 0,1.

²⁾ Wohlgemuth hat seine Methode in erster Linie für Zooamylasen (Speichel und Leberamylase) ausgearbeitet.

³⁾ Sofort nach dem Einfüllen werden die Gläschen in Eiswasser eingestellt, um die Reaktion durch die Temperaturniedrigung aufzuhalten, bis alle Gläschen gefüllt sind.

⁴⁾ Enthält dieses mit L (Limes) bezeichnete Reagenzglas z. B. 0,05 ccm Speichel, der 5 ccm Stärkelösung in z. B. 30 Minuten bei 38° zu verzuckern vermag, so würde 1 ccm Speichel imstande sein, 100 ccm Stärkelösung umzuwandeln. Die diastatische Kraft D wäre somit für 38° und bei einer Reaktionsdauer von 30 Minuten zu 100 anzugeben.

den, doch besitzt dieselbe vor derjenigen mit $\frac{1}{2}$ stündiger Versuchsdauer keine Vorteile. Eine weitere Modifikation stammt von Hawk¹⁾, der durch Zugabe einer Lösung, die im Liter 0,1 Moleküle NaH_2PO_4 , 0,2 Moleküle Na_2HPO_4 und 10 g NaCl enthält, die Neutralität des Reaktionsgemisches während der Versuchsdauer unverändert erhält.

Die Jodstärkereaktion hat auch Sahli²⁾ bei der von ihm empfohlenen schönen Methode zur Prüfung des Mageninhaltes auf dessen Stärkeverdaunungsvermögen herangezogen. Die Methode gründet sich darauf, daß das Achroodextrin, welches mit Jod keine Färbung gibt, dennoch zu demselben eine größere Verwandtschaft besitzt als die Stärke, derzufolge in einem Stärke-Achroodextringemisch erst nach Sättigung des Achroodextrins durch zugesetztes Jod die Bildung blauer Jodstärke wahrzunehmen ist.

Man verfährt dabei in der Weise, daß zu einem kleinen Teil des Filtrerrückstandes oder des Filtrats ein Tröpfchen stark verdünnte Lugolsche Lösung gesetzt wird. Tritt sofortige Bläuung ein, so ist kein Achroodextrin zugegen. Bleibt dagegen die Bläuung aus, resp. tritt sie erst bei überschüssigem Jodzusatz auf, so hatte sich Achroodextrin gebildet. Man kann diese Methode auch zur Schätzung der Intensität der Stärkeverdaunung benutzen, wenn man dem ganzen Filtrat tropfenweise, resp. mittels graduierter Kapillarpipetten $\frac{1}{100}$ -normale Jodlösung hinzufügt und die bis zur eintretenden Blaufärbung verbrauchte Menge feststellt.

Trotzdem es sich nur um verschlucktes Ptyalin und nicht um ein diastatisches Magenferment handelt, gibt die Prüfung der Stärkeverdaunung, wenngleich nur indirekt, nicht unwichtige Aufschlüsse über gastrische Störungen, und zwar in bezug auf die Salzsäuresekretion. Denn bei reichlicher Salzsäuresekretion kommt es zu einer rasch einsetzenden Hemmung der Stärkehydrolyse. Die Reaktion sistiert, bevor sich Achroodextrin bilden konnte, und schon die geringste Spur Jod wird im Reaktionsgemisch Bläuung hervorrufen. Bei anaziden Magensaften bildet sich dagegen Achroodextrin, und ein geringer Jodzusatz vermag daher die Stärke nicht zu bläuen. Immerhin mahnen die Angaben einer Anzahl Forscher zur Vorsicht, die, sei es infolge einer Schutzwirkung von seiten der Eiweißstoffe, sei es aus anderen Gründen, eine längere Fortdauer der Amylasewirkung (2 Stunden und mehr) im aziden Mageninhalt beobachtet haben³⁾.

Die Methode von Sahli besitzt vor derjenigen von Wohlgemuth den großen Vorzug mit der Prüfung des Reaktionsgemisches mit steigenden Jodmengen Aufschluß über die Menge und Art der vorhandenen Dextrine, die das Farbenbild beeinflussen, zu geben. Die bis zum

¹⁾ Hawk, Arch. intern. Med. 8 (1911) 552.

²⁾ Sahli, Lehrb. der klinischen Untersuchungsmethoden 1 (1913) 588.

³⁾ Siehe Kübel, Pfügers Archiv 76 (1899) 276; Hanford, Amer. Journ. Physiol. 4 (1900) 250; Cannon u. Day, Ebenda 9 (1903) 396; Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 9 (1903) 10; vgl. ferner Langley, Journ. Physiol. 3 246, 4 (1880—82) 18; Hensay, Münchner med. Wochenschr. (1901) 1208; Schlesinger, loc. cit.

Auftreten der Jodstärkereaktion verbrauchte Jodquantität mißt direkt den Achroodextringehalt, und zugleich lassen sich Schlüsse auf den Gehalt des Reaktionsgemisches an Erythrodextrinen ziehen.

Was hier für die Stärkespaltung angeführt worden ist, gilt mit gewissen Einschränkungen auch für den Glykogenabbau. Auch hier wird das komplizierte Polysaccharid zu einfacheren Produkten abgebaut und es läßt sich der Abbau an der Abnahme der braunen Jodreaktion verfolgen. Da es nicht bedeutungslos ist, mit welchem Substrat man die diastatische Wirksamkeit in einem bestimmten Fall ermittelt, da die Auswahl des Substrats sich vielmehr danach richten muß, ob das Ferment, dessen Wirksamkeit man prüft, unter natürlichen Bedingungen mit eben diesem Substrat in Berührung kommt, so müssen die quantitativen Diastasebestimmungen auch auf das Glykogen ausgedehnt werden. Es gilt dies namentlich für die Ermittlung der Blutdiastase, für welche die Stärke ein völlig fremdes Substrat darstellt, während sie eine weitgehende Anpassung an das Glykogen herausgebildet haben muß. Für diese Zwecke ist von H. Maggi¹⁾ im Laboratorium der Verfasserin eine Methode ausgearbeitet worden, welche sich der von Wohlgemuth für die Stärke angegebenen anschließt. Nach derselben werden zehn Reagenzgläser mit absteigenden Mengen Blutserum oder auch einem anderen diastaseführenden Material beschickt²⁾ und in jedes Gläschen 2 ccm einer $\frac{1}{2}$ %igen Glykogenlösung gefüllt. Hierauf bringt man die Gläschen in ein Wasserbad von 38°, beläßt sie darin $\frac{1}{2}$ Stunde lang, kühlt ab und setzt nunmehr zu jedem Gläschen $\frac{1}{10}$ ccm einer halbverdünnten Lugolschen Lösung zu. Während die gleichzeitig angesetzte Kontrolle, welche an Stelle von 1 ccm der Fermentlösung oder ihren Verdünnungen 1 ccm destilliertes Wasser enthält, hierbei die tiefbraune Jodglykogenfärbung annimmt, zeigen die Gläschen, welche von dem diastaseführenden Material erhalten haben, je nach ihrer

¹⁾ H. Maggi, nicht veröffentlichte Versuche.

²⁾ Die Verdünnungen werden in der Weise hergestellt, daß man 10 Reagenzgläser mit je 1 ccm Wasser (oder bei jodbindendem Material dem gekochten Ferment) beschickt und in das erste derselben 1 ccm der Fermentlösung einträgt. Hierauf überträgt man aus diesem Gläschen (nach gründlichem Vermischen) 1 ccm auf das nächste, in welchem somit die Verdünnung des Ferments $\frac{1}{4}$ beträgt. Von diesem wiederum auf das nächste, das nun die Konzentration $\frac{1}{8}$ enthält und so fort. Aus dem letzten Gläschen, in dem die Fermentkonzentration $\frac{1}{512}$ ist, wird der überschüssige Kubikzentimeter entfernt und ein weiteres Röhrchen mit 1 ccm reinem Serum oder einem anderen diastaseführenden Material, und eines mit 1 ccm Wasser bzw. gekochtem Ferment beschickt (Glykogenkontrolle).

Fermentkonzentration eine stärkere oder weniger starke Abnahme der Jodglykogenreaktion, die bei diastasereichen Flüssigkeiten in den stärksten Konzentrationen sogar völlig ausbleibt.

Die Methode hat den Vorteil, äußerst rasch zum Ziel zu führen und die mühsame Diastasebestimmung mittels Glykogen zu umgehen, welche darauf beruht, daß man zu der fermenthaltigen Lösung eine bestimmte Menge Glykogen zusetzt, während einer gewissen Zeit das Reaktionsgemisch im Brutschrank sich selbst überläßt und hierauf die Quantität des unveränderten Glykogens bestimmt.

Diese Methode wird in der Weise ausgeführt, daß 10 ccm der auf ihren Diastasegehalt zu untersuchenden Fermentlösung oder 50—100 g eines Organbreis, dessen Diastasegehalt ermittelt werden soll, mit 20—30 ccm einer 5%igen Glykogenlösung und etwas Toluol bei Brutschranktemperatur 24 Stunden sich selbst überlassen bleiben. Unter den gleichen Bedingungen hält man eine Kontrolle, welche die nämlichen Quantitäten des fermentführenden Materials in abgekochtem Zustand und die nämliche Menge (20—30 ccm) der Glykogenlösung enthält. Nach 24 Stunden wird in beiden Proben die Menge des noch vorhandenen Glykogens ermittelt und aus der Differenz der beiden Bestimmungen auf den diastatischen Effekt des fermentführenden Materials geschlossen. Die Glykogenbestimmung selbst wird nach der Pflügerschen Methode ausgeführt, die sich in der ersten Hälfte des Spez. Teils im Kapitel „Katalyse durch Wasserstoffionen“ besprochen findet. Die Glykogenbestimmung erfolgt auf polarimetrischem Wege nach erfolgter Inversion des unveränderten Glykogens (siehe die Angaben in der ersten Hälfte des Spez. Teils). Eine Fehlerquelle der Methode ergibt sich aus der ungemein großen Empfindlichkeit gegenüber der zur Fällung benutzten Alkoholkonzentration. Die geringste Abweichung von der vorschriftsmäßigen Konzentration von 96% des zur Fällung benutzten Alkohols bedingt ein unvollständiges Ausfallen des restierenden Glykogens, wie sich H. Maggi durch Nachkontrollierung der Methode mit reinen Glykogenlösungen überzeugen konnte.

Physikalisch-chemische Verfahren.

Schon der Abschnitt über die Diastasebestimmung durch Ermittlung des Verschwindens der Stärke leitete in den Verfahren, die sich der Stärkeverflüssigung bedienen, zu mehreren Methoden über, welche denselben Vorgang indirekt beobachten und messend verfolgen.

Zunächst ist der zunehmende Aufteilungsprozeß an der Aufhellung der Lösungen¹⁾ kenntlich, und es könnte dieses Verhalten als Basis eines der Jacobyschen Methode der Bestimmung eiweißspaltender Fermente (loc. cit.) analogen Verfahrens gewählt werden. Auch ließe sich die zunehmende Durchsichtigkeit der Lösungen durch Beobachtung eines hellen Gegenstandes, z. B. des Fadens einer Glühlampe verfolgen, dessen reelles, in einer Stärkesuspension erzeugtes und

¹⁾ Samec, Kolloidchem. Beihefte 4 (1912/13) 132; Samec u. Jencic, Ebenda 7 (1915) 141, 142.

durch Fernrohr beobachtetes Bild schon zur Feststellung der Quellungstemperatur von Samec¹⁾ in Anwendung gebracht worden ist. Dieser Forscher betrachtet Quellungstemperatur und maximales Quellungsvolumen (das er durch Zentrifugieren der fraglichen Stärkelösungen und Messung des abgesetzten Bodenkörpers bestimmt) als Maß der Hydrophilie.

Mit der Aufteilung Hand in Hand geht die zunehmende Filtrationsfähigkeit, die Malfitano und Moschkoff²⁾ dadurch verfolgen, daß sie die in gleichen Zeiten erhaltenen Filtratmengen und deren Gehalt bei verschiedenen lang behandelten Stärkeproben ermitteln. Daß es sich bei diesen Forschern lediglich um die Feststellung der Verkleinerung der „Stärkemizellen“ durch Kochen handelte, macht die Methode nicht weniger geeignet zur Verfolgung eines diastatischen Abbaugemisches.

Neben der gewöhnlichen Filtration kommt die osmotische Filtration — die Dialyse — durch semipermeable Membranen in Betracht, durch welche eine Trennung komplexerer kolloider Teilchen von niedriger molekularen kristalloiden Teilchen ermöglicht wird. Von Fouard³⁾ sind hierzu Kollodiummembranen in Vorschlag gebracht worden, die in der Folge auch Samec⁴⁾ verwendet hat, während H. Maggi⁵⁾ zu demselben Zweck bei Formaldehyd-Stärkegemischen Pergamentmembranen gebrauchte.

Samec (loc. cit.) hat die dialytische Methode (welche bei den von ihm verwendeten Kollodiummembranen Stärkeabbauprodukte vom Molekulargewicht 2000 abwärts in das äußere Gefäß des Dialysators⁶⁾ permeieren läßt, während die höheren Dextrine und die Stärke vom Molatgewicht über 100 000 infolge ihrer kolloiden Natur im inneren Gefäß zurückgehalten werden) mit der von Biltz⁷⁾ zuerst zur Untersuchung des diastatischen Stärkeabbauprozesses benutzten osmotrischen Methode kombiniert. Samec⁸⁾ verfährt dabei in der

¹⁾ Samec, Ebenda 3 (1912) 123, hat gezeigt, daß das ursprünglich scharfe Bild des glühenden Fadens bei einsetzender Quellung verschwimmt. Im vorliegenden Fall müßte dagegen das Bild an Schärfe gewinnen.

²⁾ Malfitano u. Moschkoff, Bull. Soc. Chim. de France [4] 11 (1912) 606.

³⁾ Fouard, L'état colloidal de l'amidon et sa const. physico-chim., Paris 1911.

⁴⁾ Samec u. Jencic, Kolloidchem. Beihefte 7 (1915) 143; Samec, Ebenda 10 (1919) 290 ff.

⁵⁾ H. Maggi, Fermentforschung 2 (1919) 320 ff., 378, 379.

⁶⁾ Siehe über Dialysatorformen im Kapitel: Eiweißspaltende Fermente.

⁷⁾ W. Biltz, Ber. d. chem. Ges. 46 (1913) 1532; Zeitschr. f. physik. Chem. 83 (1913) 703.

⁸⁾ Samec u. Jencic, loc. cit. u. Samec, Fußnote 4, diese Seite.

Weise, daß er die zu untersuchende 2%ige Lösung in ungefähr 50 ccm fassende, mit Steigröhren versehene Osmometersäcke einfüllt und in so viel destilliertes Wasser einstellt, daß für das äußere und innere Gefäß Niveaugleichheit besteht. Wo eine längere Versuchsdauer dies erforderte, wurde Kampfer als Desinfiziens hinzugefügt. Das Wasser im äußeren Gefäß wurde häufig erneuert, um sicher zu sein, daß der gefundene osmotische Druck nur durch den Inhalt des inneren Gefäßes verursacht war, der vor und nach dem Versuch durch Bestimmung des Trockengehaltes ermittelt wurde. Die Trockengehaltsdifferenz bildete das Maß für die in der betreffenden Zeit durch die Membran permeierte Substanz, während die Steighöhe im Druckmaximum, das meist in 12—24 Stunden erreicht wird, und der nach Schluß des Versuches erhaltene Trockengehalt das Molekular- bzw. Molatgewicht ergibt ¹⁾, gemäß der Formel:

$$M = \frac{231516 \cdot \text{Konzentration im Liter}}{h \text{ in Millimetern}}.$$

Unter Berücksichtigung der Konzentration im äußeren und inneren Gefäß des Dialysators berechnet sich die mittlere Molatgröße des kolloiden Inhaltes des inneren Gefäßes zu

$$M = \frac{231516 \cdot 10 (c' - c'')}{h}$$

bei Vernachlässigung der Temperatur- und Luftdruckeinflüsse.

Es bedeutet in dieser Formel M das Molatgewicht, c' die nach Einstellung des Gleichgewichtes vorhandene Konzentration im Osmometer, c'' die Konzentration im Außengefäß und h die Steighöhe.

Die am osmotischen Druck nicht beteiligte Substanzmenge

$$= \frac{(v' + v'') c''}{100}$$

bzw. in Prozenten der zu Anfang in Lösung befindlichen Substanz ausgedrückt:

$$Kr = \frac{(v' + v'') \cdot c'' \cdot 100}{v' c' + v'' c''},$$

demgegenüber

$$Ko = \frac{(c' - c'') v'}{100}.$$

Es bedeuten Ko und Kr die Kolloid- und Kristalloidanteile, v' das Flüssigkeitsvolumen im Innengefäß, v'' dasjenige im Außengefäß, und c' und c'' die entsprechenden Konzentrationen in den beiden Gefäßen.

¹⁾ Unter „Molat“ ist Molekülaggregat zu verstehen (S a m e c, loc. cit. ebenda, S. 290).

An Stelle der direkten Messung der mit der Aufteilung einhergehenden Steigerung des osmotischen Druckes kann man auch indirekt die Messung der mit der Spaltung einhergehenden Zunahme der Gefrierpunkterniedrigung im Beckmannschen Apparat ermitteln, wobei jedoch nach Samec (loc. cit.) erst dann eindeutige Resultate erhalten werden, wenn die Spaltung so weit vorgeschritten ist, daß die Abbauprodukte beim Gefrieren nicht mehr koagulieren. Andererseits bildet gerade das Ausbleiben der Kältekoagulation¹⁾ einen weiteren Anhaltspunkt für die Beurteilung des Abbaugrades eines diastatischen Stärkespaltgemisches, wie dies auch für die Fällbarkeit mittels Alkohol zutrifft. Je höher molekular ein Stärkeabbauprodukt ist, desto geringere Alkoholkonzentrationen benötigt es zu seiner Fällung, ein Umstand, der zur fraktionierten Fällung der Dextrine von Lintner praktisch nutzbar gemacht worden ist. Für den Stärkeabbau wurde diese Art der Verfolgung der mit der Spaltung einhergehenden Zunahme der Dispersität von Samec²⁾ benutzt, gestützt auf analoge Untersuchungen von Pauli³⁾ an Eiweiß, wobei er auf je 3 ccm der gewöhnlich 1%igen Stärkelösung 0,3 ccm (oder ein Vielfaches davon) von 96%igem Alkohol verwendete und als aufeinander folgende Grade der Ausflockung die Stufen: ganz klar, Tyndallphänomen, Trübung, Trübung mit Tendenz zur Niederschlagsbildung, Niederschlag mit überstehender trüber Flüssigkeit und Niederschlag mit überstehender klarer Flüssigkeit auseinander hielt. Mit der Verminderung der Molatgröße geht ferner, wie zuerst Biltz⁴⁾ gezeigt hat, eine Abnahme der Viskosität parallel, und es ist diese letztere auch von Pauli und Handovsky⁵⁾ mit der Hydratation in engste Beziehung gebracht worden. Samec (loc. cit.) hat sich zur Verfolgung dieses wichtigen Kriteriums der Stärkespaltung eines Ostwaldschen Viskosimeters bedient, während H. Maggi⁶⁾ und die Verfasserin⁷⁾ das Viskosimeter von Heß zur Verfolgung des viskosimetrischen Verhaltens von Formaldehyd-Stärk gemischen verwendeten, da dieser einfache Apparat zugleich eine Schätzung der ebenfalls nach Galeotti⁸⁾ mit der diastatischen Spal-

¹⁾ Die Kältekoagulation wurde von Malfitano u. Moschkoff. Compt. rend. 150 (1910) 710, 151 (1910) 817, zur Herstellung aschefreier Stärke benutzt.

²⁾ Samec, Kolloidchem. Beihefte 5 (1913) 190.

³⁾ Pauli, Fortschr. d. naturw. Forschung 4 (1912) 223.

⁴⁾ W. Biltz, Zeitschr. f. physik. Chem. 83 (1913) 703.

⁵⁾ Pauli u. Handovsky, Biochem. Zeitschr. 18 (1909) 340.

⁶⁾ H. Maggi, Fermentforschung 2 (1919) 355—363.

⁷⁾ G. Woker, Ber. d. chem. Ges. 49 (1916) 2315.

⁸⁾ Galeotti, Zeitschr. f. physik. Chem. 76 (1911) 105.

tung der Stärke einhergehenden Volumenabnahme des Systems ermöglicht. Genauere Bestimmungen der Volumenabnahme müssen natürlich mit dem Ostwaldschen Dilatometer ausgeführt werden.

Die Viskositätsverminderung kann noch eine andere Ursache haben, die allerdings für die diastatische Spaltung nicht in Frage kommt, sondern lediglich für die Viskositätsabnahme, welche an Stärkelösungen unter dem Einfluß hoher Temperaturen hervorgerufen wird. Zum Unterschied von der diastatischen Spaltung, welche den Phosphorsäuregehalt der Stärke bis zu einem sehr tiefgehenden Abbau nicht tangiert, sondern lediglich die Bindungen zwischen den Kohlenhydratkomplexen hydrolysiert, würde beim Erhitzen in wäßriger Lösung nach Samec¹⁾ die wahrscheinlich esterartige Bindung der Stärke an die Phosphorsäure gelöst. Dem Uebergang der Amylophosphorsäure, welche nach Samec (loc. cit.) dem Amylopektin²⁾ des Stärkekorns entspricht, in die phosphorfreien Amylosen³⁾, würde ebenfalls ein sehr starker Viskositätsabfall folgen. Dieser würde aber zum Unterschied von der diastatischen Veränderung weder von einer Vermehrung des Dispersitätsgrades (Verminderung der Molatgröße), noch von einer nach Harrison⁴⁾ zum Dispersitätsgrad in enger Beziehung stehenden Aenderung der Jodfarbe aus dem violett (Amylopektin)-blauen (Stärke) Farbgebiet begleitet sein. Erst nach Zerlegung der Amylophosphorsäure würden dann auch die Bindungen der Kohlenhydratkomplexe unter sich angegriffen⁵⁾.

Dieser in den ersten Phasen des Stärkeabbaus verschiedene Spaltungsmodus, der offenbar nicht eine prinzipielle Verschiedenheit zwischen einfacher Wasserhydrolyse und fermentativem Abbau bedeutet (was mit dem Begriff der Fermente als Katalysatoren unvereinbar wäre), sondern auf der ungleichen Beschleunigung zweier Simultanreaktionen durch Temperaturerhöhung und Fermenteinfluß basiert, läßt sich einerseits direkt durch Phosphorsäurebestimmung⁶⁾, anderseits durch Mes-

¹⁾ Samec, Kolloidchem. Beihefte 6 (1914) 23.

²⁾ Maquenne u. E. Roux, Ann. Phys. Chim. [9] 8 (1906) 179; Grunzewska, Journ. de Physiol. et de Pathol. gén. 14 (1912) 7.

³⁾ Nach Maquenne u. E. Roux, loc. cit. vorige Fußnote, als Amylozellulose und Granulose bezeichnet. Siehe ferner über andere Bezeichnungen: v. Mohl, Bot.-Ztg. (1859) 225; v. Nägeli, Bot. Mitteil. (1863) 387. 415; A. Meyer, Untersuchungen über die Stärkekörner, Jena 1895; de Vries, Just bot. Jahresber. 1 (1885) 122; v. Syniewski, Ann. Chem. 309 (1899) 212.

⁴⁾ Harrison, Zeitschr. f. Kolloide 9 (1911) 5.

⁵⁾ Samec u. v. Hoeffft, Kolloidchem. Beihefte 5 (1913/14) 141.

⁶⁾ Samec, Kolloidchem. Beihefte 6 (1914) 23.

sung der elektrischen Leitfähigkeit verfolgen. Eine Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit ist bei der diastatischen Spaltung, entsprechend der mangelnden Abgabe von Phosphorsäure, so gut wie gar nicht zu beobachten, während die in der Hitze stattfindende Aenderung der Stärke von einer sehr starken Leitfähigkeitszunahme begleitet ist. Gleichzeitig nimmt auch die titrierbare Azidität der nach Wolff und Fernbach¹⁾ gegen Phenolphthalein sauer und gegen Methylorange basisch reagierenden Stärkelösungen beim Kochen zu; ebenso die durch elektrometrische Messungen nach Sørensen²⁾ z. B. mit dem Paulischen Apparat³⁾ feststellbare aktuelle Azidität⁴⁾. Der anodische kolloide Stärkerest verliert zugleich mit dem Uebergang vom Amylopektin zum phosphorsäurefreien Kohlenhydrat seinen elektronegativen Charakter⁵⁾. Die Amylosen sind elektrisch neutral und folglich nicht mehr zur kataphoretischen Wanderung befähigt.

Auch auf polarimetrischem Wege läßt sich das Stärkeverzuckerungsvermögen von Diastaselösungen verfolgen. Doch konnte die Verfasserin mit H. Maggi (loc. cit.) eine wesentliche Abnahme der Drehung erst bei einer relativ weit vorgeschrittenen Spaltung konstatieren.

Auch Samec (loc. cit.)⁶⁾ kam auf Grund seiner sehr eingehenden Versuche zum Schluß, daß erst bei sehr vorgeschrittenem Abbau Aenderungen in den Symmetrieverhältnissen des Stärkemoleküls auftreten. Dies steht im Gegensatz zu den übrigen vorher besprochenen Erscheinungen, die gerade zu Anfang der Stärkespaltung am auffallendsten sind, wie Viskositätsabnahme, Zunahme der Gefrierpunkts erniedrigung, Abnahme des Molatgewichtes, Zunahme des Reduktionsvermögens und der elektrischen Leitfähigkeit.

Aus diesem Grunde dürfte sich mehr noch als die überhaupt wenig empfindliche und durch Störungen wie die Multirotation in Mit leidenschaft gezogene polarimetrische Methode das interferometrische Verfahren zur Beobachtung und Messung des diastatischen Stärkeabbaus eignen. Die Methode reagiert auf die minimsten Konzentrationsveränderungen gegenüber der ursprünglichen als Vergleichs-

¹⁾ Wolff u. Fernbach, *Compt. rend.* **140** (1905) 1403, **143** (1906) 363, 380.

²⁾ Sørensen, *Biochem. Zeitschr.* **21** (1909) 53.

³⁾ Pauli, *Biochem. Zeitschr.* **52** (1913) 371.

⁴⁾ Siehe über den Unterschied von potentieller und aktueller Azidität die vorausgegangenen beiden Bände der Katalyse.

⁵⁾ Botazzi, *Atti d. Reale Accad. dei Lincei Roma* **18** [II] (1909) 87; Botazzi u. Victorow, *Ebenda* **19** [II] (1910) 7.

⁶⁾ Siehe ferner Fouard, *Compt. rend.* **146** (1908) 285, 978, **147** (1908) 813.

flüssigkeit dienenden Lösung, wie dies eingehend im Abschnitt über die Abwehrfermente ausgeführt ist, so daß sich eine Beschreibung an dieser Stelle erübrigt. Zudem fehlen noch für das interferometrische Verfahren wie auch für eine andere physiko-chemische Methode, die im Gebiet der proteolytischen und lipolytischen Fermente Verwendung findet, die Meistagminreaktion (Messung von Aenderungen der Oberflächenspannung), praktische Erfahrungen über ihre Anwendbarkeit zur Messung des Stärkeabbaus. Ein erster Anfang für die Einführung der letztgenannten Methode in diesem Gebiet findet sich in der Arbeit von H. Maggi (loc. cit.) über die Frage der Diastasemodelleigenschaften des Formaldehyds, woselbst auch eine noch weiterer Ausarbeitung harrende wichtige physiko-chemische Methode, die Kapillarisierung (Grüß, loc. cit.), für die Frage des Stärkeabbaus in Betracht gezogen worden ist. Ferner sei noch die von Fouard¹⁾ benutzte Beobachtung der im Verlauf des Stärkeabbaus vor sich gehenden ultramikroskopischen Veränderung erwähnt. Endlich wären in Betracht zu ziehen: die Aenderung des Adsorptionsvermögens der Stärke gegenüber Laugen und Salzen²⁾, sowie gegenüber Farbstoffen³⁾ — und möglicherweise die im Gefolge der Stärkespaltung auftretenden Gerinnungserscheinungen⁴⁾. Diese letzteren würden nach Lintner auf der Spaltung der als Schutzkolloide für die schwerlöslichen hochmolekularen Körper fungierenden dispersen Anteile (niedrige Dextrine) beruhen⁵⁾, während demgegenüber Fernbach und Wolff (loc. cit.) eine resynthetisierende Amylokoagulase für diesen Prozeß verantwortlich machen.

Die Beeinflussung der diastatischen Wirksamkeit von Körperflüssigkeiten durch pathologische Zustände und die Zusammensetzung der Nahrung.

Was das Anwendungsbereich der Diastasebestimmung betrifft, so ist außer den schon genannten analytischen Anwendungen z. B. die Methode von Müller⁶⁾ von ihm selbst insbesondere für die Feststellung der diastatischen Wirksamkeit des Speichels empfohlen worden.

¹⁾ Fouard, Compt. rend. **146** (1905) 978; Gatin-Gruzewska, A. Mayer u. G. Schaeffer, Compt. rend. Soc. Biol. **64** (1908) 599.

²⁾ Vemoussy, Compt. rend. **142** (1906) 933.

³⁾ H. Fischer, Beihefte z. bot. Zentralbl. (1905) 409; vgl. auch Fouard, Zeitschr. f. Kolloide **4** (1909) 185.

⁴⁾ Fouard, Compt. rend. **146** (1908) 285, 978, **147** (1908) 813, 931.

⁵⁾ Siehe Sallinger, Zeitschr. f. Kolloide **25** (1919) 79.

⁶⁾ Eduard Müller, Zentralbl. f. innere Medizin **29** (1903) 386.

Diese Bestimmung kann unter Umständen für den Mediziner von Bedeutung sein. So fanden Simon¹⁾ und Pagliai²⁾ bei akuten Infektionskrankheiten und kachektischen Zuständen und Petteruti³⁾ bei Anämie eine Verminderung der diastatischen Wirksamkeit des Speichels. Bei Soor soll die Diastase sogar gänzlich fehlen⁴⁾. Anormal verhält sich ferner der Speichel wie auch der Liquor cerebrospinalis gewisser Geisteskranker. Christiani⁵⁾ fand die Amylase vermehrt. Pini⁶⁾ gibt an, daß bei Dementia praecox ein dem nach Sympathikusreizung sezernierten Speichel⁷⁾ analoger Speichel erhalten wird, der bei Aufregungszuständen eine erhebliche Erhöhung, später eine starke Verminderung der diastatischen Wirksamkeit erkennen läßt⁸⁾. Kafka (loc. cit. im folgenden) erwähnt den gegenüber dem geringen Normalgehalt des Liquor cerebrospinalis stark erhöhten Diastasegehalt bei Paralyse, ferner, wenn auch nicht so ausgeprägt, bei Dementia praecox, Alkoholismus, senilen Degenerationserscheinungen und akuten Meningitiden. Normalerweise schwankt nach Müller (loc. cit.) die relative fermentative Kraft des Speichels nur wenig. Die Wirkungsverschiedenheiten sollen nur von der Speichelmenge abhängen. Demgegenüber geben jedoch Neilson und Lewis⁹⁾ an, daß die Ermittlung der Diastase von der Nahrung in hohem Grade beeinflusst wird, indem sie bei vorwiegender Amylazeenkost reichlich, bei Fleischkost dagegen nur spärlich abgeschieden werden soll¹⁰⁾; doch sind diese Angaben wiederum

¹⁾ Simon, Journ. Physiol. Pathol. 9 (1907) 261.

²⁾ Pagliai, Riv. crit. chim. Med. 11, 341.

³⁾ Petteruti u. Ferro, Giorn. internaz. Scienz. Med. 14, 921; vgl. auch Litmanowicz u. E. Müller, Zentralbl. f. Physiol. u. Pathol. d. Stoffwechsels [N. F.] 4 (1909) 81.

⁴⁾ Zweifel, Untersuchungen über den Verdauungsapparat der Neugeborenen. Berlin 1874.

⁵⁾ Christiani, Zentralbl. f. med. Wissensch. (1905) 506.

⁶⁾ Pini, Clinica moderna (1907) Heft 21.

⁷⁾ Siehe S. Ryan, Amer. Journ. Physiol. 24 (1909) 234.

⁸⁾ Ueber Untersuchungen am pathologischen Speichel (Angina catarrhalis, Tuberkulose, Diabetes, Magendarmstörungen), die keine Veränderung der diastatischen Wirksamkeit ergeben haben, siehe Wieselmann, Over het specksel bij Diabetes, Dissert., Leiden 1879; Salkowski, Virchows Archiv 109 (1887) 358; Jawein, Wiener med. Presse (1892) 578; Burger, Münchner med. Wochenschr. (1896) 220; Litmanowicz u. E. Müller, Zentralbl. f. Physiol. u. Pathol. des Stoffwechsels [N. F.] 4 (1909) 81.

⁹⁾ Neilson u. Lewis, Journ. Biol. Chem. 4 (1908) 501.

¹⁰⁾ Für die Blutamylase besteht dieselbe Streitfrage. Ascoli u. Bonfanti, Münch. med. Wochenschr. 51 (1904) II, 1466, behaupten eine Vermehrung bei Ernährung mit Amylazeen, während Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 21 (1909)

sowohl von Carlson und Chittenden¹⁾ wie von Mendel, Chapman und Blood²⁾ bestritten worden. Nur so viel scheint sicher zu sein, daß Tiere, die seit Generationen nur an Fleischkost angepaßt sind (Karnivoren), einen diastasefreien Speichel sezernieren³⁾. Auch hat sich nach Hirata⁴⁾ für ein anderes amylaseführendes Sekret, dasjenige der Pankreasdrüse, eine sehr bemerkenswerte Abhängigkeit von der Ernährung ergeben⁵⁾, wenn auch mit Bestimmtheit nur bei einer Tierart⁶⁾. Wohlgemuth fand bei ein und derselben Person nach seiner Methode Schwankungen des Wertes D von 156—500 für 60 Minuten Reaktionsdauer. Die größte von ihm überhaupt nachgewiesene diastatische Kraft D eines Speichels betrug 780, die kleinste 125. Doch kann dies auch an der für vergleichende Bestimmungen noch viel zu wenig kritisch überprüften Wohlgemuthschen Methodik liegen. Es darf nicht übersehen werden, daß die Resultate mit den geringsten Schwankungen des Jodzusatzes, mit der Frische der Jodlösung, mit dem Grad der Verdünnung nach erfolgtem Jodzusatz, wie auch mit den Begleitstoffen der Diastase erheblich variieren⁷⁾. Dosierung mittels feinsten Meßpipetten, frische Herstellung der Jod-Jodkalilösung von streng kontrolliertem Wirkungswert und genauestes Einhalten der gleichen Verdünnung muß von der Methode erst gefordert werden. Darüber, ob Tagesschwankungen im Diastasegehalt bzw. der Diastasewirkung⁸⁾ des Speichels vorkommen, gehen daher begreiflicherweise

381; O. Loewi, Marburger Sitzungsber. (1905), sowie Macleod u. Pearce, Amer. Journ. Physiol. 25 (1910) 255, dies bestreiten.

¹⁾ Carlson u. Chittenden, Amer. Journ. Physiol. 26 (1910) 169.

²⁾ Mendel, Chapman u. Blood, Med. Record 78 (1910) 349.

³⁾ Auch der Schlangenspeichel ist nach Launay, Ann. des Sc. nat. 18 1: Malys Jahrb. (1903) 735, amylasefrei, während derjenige einiger Fische Amylase führt (Krukenberg, Untersuch. aus dem physiol. Institut Heidelberg 2, 389).

⁴⁾ Hirata, Biochem. Zeitschr. 27 (1910) 385.

⁵⁾ Mit Brot ernährte Ratten zeigten eine 300—500mal so kräftige diastatische Wirksamkeit ihres Pankreassekretes als mit Speck ernährte.

⁶⁾ Vgl. die negativen Versuche von Bradley, Journ. Biol. Chem. 6 (1909) 133, u. Rinaldini, Arch. di Farmac. 13 (1912) 241, sowie diejenigen von Ambard u. Binet, Soc. Biol. 65 (1908) 259.

⁷⁾ Diese Faktoren sind namentlich dann von größter Wichtigkeit, wenn noch unveränderte Stärke im Reaktionsgemisch vorhanden ist, da die Jodstärke-reaktion durch alle Stoffe, welche die im System vorhandene JOH zersetzen, sehr stark in ihrer Empfindlichkeit gesteigert wird (Skrabal, Sitzungsber. d. k. Akad. d. Wiss. Wien), wodurch die Joddextrinreaktionen verdeckt werden [vgl. Woker u. Maggi, Ber. d. chem. Ges. 52 (1919) 1601].

⁸⁾ Schwankungen im Gehalt an diastaseaktivierenden Salzen können, wie

die Ansichten auseinander¹⁾. Außer der Ermittlung des Ptyalins²⁾ — der Speichelamylase — kann auch die Ermittlung der diastatischen Kraft des Blutes in Betracht kommen. So ziehen Wohlgemuth und Noguchi³⁾ die Feststellung einer Vermehrung der Blutdiastase gegenüber der Norm zur Diagnose subkutaner Pankreaszerreißungen heran. Auch nimmt die Blutdiastase nach Vigliani⁴⁾ bei Vergiftungen durch Phosphor und Phlorizin zu. Ferner sollen Kachexien verschiedenen Ursprungs, schwerer Diabetes, chronische Pankreatitis und Pankreaskopfkarzinome, von einer Herabsetzung des Amylasegehaltes des Pankreassekretes begleitet sein⁵⁾, die am Fehlen oder der Verminderung des Amylasegehaltes der Fäzes⁶⁾ erkannt werden kann, wo nicht eine solche Konzentrationsverminderung den Diastasedurchfällen zuzuschreiben ist⁷⁾.

Auch sollen Pankreaserkrankungen und Nephritiden von Aenderungen des Diastasegehaltes des Harns begleitet sein⁸⁾. Bei sub-Brunaci, Arch. di Fisiol. 6 (1909) 153, betont hat, Schwankungen des an und für sich ja überhaupt nicht meßbaren Fermentgehaltes vortäuschen.

¹⁾ Siehe darüber Müller, Dissert., Freiburg 1899; Schüle, Archiv f. Verdauung 5 (1899) 165; Schultz, Oppenheimers Handb. d. Biochem., Bd. 3, Jena 1908, S. 137; Wohlgemuth loc. cit.

²⁾ Ueber den von Berzelius stammenden Namen und die ersten Untersuchungen dieses Fermentes, welche an die Namen von Leuchs, Kastners Archiv f. d. ges. Naturlehre (1831), Schwann, Pogg. Ann. 38 (1836) 359; Mialhe, Compt. rend. 20 (1854) 954; Cohnheim, Virchows Archiv 28 (1865) 241; Paschutin, Archiv f. Anatomie u. Physiol. (1871) 305, 352; Seegen, Zentralbl. f. med. Wissensch. (1876) 849; Musculus u. v. Mering, Zeitschr. f. physiol. Chem. 2 (1878) 503; v. Mering, Ebenda 5 (1881) 185; Nasse, Pflügers Archiv 11 (1875) 145, 14 (1877) 477, und Külz, Ebenda 24 (1881) 81, geknüpft sind, siehe Schlesinger, Virchows Archiv 125 (1891) 146.

³⁾ Wohlgemuth u. Noguchi, Berliner klin. Wochenschr. (1912) Nr. 23; Langenbecks Archiv 98 (1912) Heft 2.

⁴⁾ Vigliani, Gaz. d. osped. (1904) 61; Biochem. Zentralbl. 3, 185.

⁵⁾ Gaston-Durand, Internat. Beitr. zur Pathol. und Therapie der Ernährungstörungen 2 (1911) 14.

⁶⁾ v. Jaksch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 12 (1888) 116; Binder, Dissert., Berlin 1911; Wohlgemuth, Berliner klin. Wochenschr. (1910) Nr. 3; Hawk, Arch. internat. Med. 8 (1911) 552.

⁷⁾ Hirayama, Zeitschr. f. experim. Pathol. 13 (1911) 624, fand bei Säuglingen, die an Durchfall litten, keine Diastase in den Fäzes, während sie sich bei normalen Säuglingen nach Eva Hoffmann, Jahrb. f. Kinderheilkunde 72 (1910) 280, und Allaria, Il progresso medico (1905) Nr. 20—22; Biochem. Zentralbl. 5 (1905) 1028; vgl. ferner Pottevin, Soc. Biol. 52 (1900) 589, und A. F. Heß, Proc. Soc. Exp. Biol. New York 9 (1911) 20, darin findet.

⁸⁾ v. Benczur, Wiener klin. Wochenschr. (1910) 890; Wynhausen, Berliner klin. Wochenschr. 47 (1910) 2107.

kutaner Pankreasruptur oder ganzem oder teilweisem Verschuß des Pankreasgangs ist nach Wohlgemuth¹⁾ der Diastasegehalt des Harns erhöht, und seine Ermittlung hat folglich diagnostischen Wert. Das gilt auch vom umgekehrten Fall der Feststellung eines subnormalen Diastasegehalts des Harns bei erkrankter Niere, wobei nach Wohlgemuth²⁾ der aus beiden Nieren gleichzeitig geflossene Harn getrennt aufgefangen und untersucht werden muß. Nadina Sieber³⁾ und Griniew⁴⁾ haben endlich eine ziemlich starke Steigerung der diastatischen Wirksamkeit in den Muskeln bei Infektionen mit Tuberkelbazillen festgestellt, der gegenüber die Leber nur eine geringe und andere Organe gar keine Steigerung oder im Gegenteil eine Hemmung erkennen ließen, während für die lipolytische Fähigkeit die Störung zwar Knochenmark und Gehirn am stärksten betrifft, alle übrigen Organe aber gleichfalls beeinflußt. Staphylokokkeninfektionen bewirken eine generelle Steigerung der fermentativen Prozesse, insbesondere der lipolytischen. Die Hoffnungen, welche an die Bestimmung der Diastase des Blutes in bezug auf die Erkenntnis des Wesens des Diabetes mellitus geknüpft worden sind, haben sich dagegen nicht bestätigt, was aus theoretischen Gründen durchaus verständlich ist⁵⁾. Die völlig widersprechenden Angaben in der Literatur⁶⁾ lassen den Gedanken aufkommen, daß vorgefaßte Meinungen auf diesem Gebiet eine allzu große Rolle gespielt haben. Das nämliche gilt auch hinsichtlich der Harndiastase, von welcher die einen Autoren angeben, daß sie bei Diabetes fehlen könne oder vermindert sei⁷⁾, während sie von anderer Seite beobachtet worden ist⁸⁾.

¹⁾ Wohlgemuth u. Noguchi, loc. cit.; Wohlgemuth, Berliner klin. Wochenschr. (1910) Nr. 3.

²⁾ Wohlgemuth, Ebenda (1910) Nr. 31; Zeitschr. f. Urologie 5 (1911) 801.

³⁾ Nadina Sieber, Biochem. Zeitschr. 32 (1911) 108.

⁴⁾ Griniew, Arch. des Soc. Biol. Petersburg 17 (1912) 176.

⁵⁾ Siehe *Allg. Teil*, S. 569, 570.

⁶⁾ Siehe Kußmaul, Archiv f. klin. Medizin 14 (1874) 42; Lépine u. Barral, Compt. rend. 113 (1891) 1014; Lépine, Wiener med. Presse 33 (1892) Nr. 26 ff.; Hildebrandt, Berliner klin. Wochenschr. 29 (1892) Nr. 1; Virchows Archiv 131 (1893) 12; Bang, Hofmeisters Beitr. 10 (1907) 320; Bainbridge u. Beddard, Biochem. Journ. 2 (1907) 89; Schlesinger, Deutsche med. Wochenschrift 34 (1908) 593; Zegla, Biochem. Zeitschr. 16 (1909) 111; Starkenstein, Ebenda 24 (1910) 191; Schirokeuer u. Wilenko, Zeitschr. f. klin. Med. 70 (1910) 103, 257; Wynhausen, Berliner klin. Wochenschr. 47 (1910) 1281; Macleod u. Pearce, Amer. Journ. Physiol. 27 (1911) 341. 28 (1911) 403, 29 (1912) 419; Ghedini, La clin. med. ital. 51 (1912) 146; Zentralbl. f. Biochemie 14 (1913) 1526.

Zur Theorie der Diastasewirkung.

Was die Theorie der Diastasewirkung betrifft, so wurde schon in der Einleitung dieses Bandes auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die Aldehydgruppe, welche den Fermenten von den verschiedensten Seiten zugeschrieben wird, mit dem Mechanismus fermentativer Hydrolysen in dem Sinne in Zusammenhang stehen könnte, daß sie unter Addition der Elemente des Wassers H und OH in die unbeständige Hydratform übergeht. Diese Reaktion würde sich in jeder wäßrigen diastasehaltigen Lösung vollziehen. Zugleich müßten aber die gebildeten Hydratmoleküle wieder zerfallen unter Abspaltung der Elemente des Wassers, so daß in der Fermentlösung sich bildende und zerfallende Aldehydhydrate nebeneinander bestehen würden. Man hätte es mit einem dynamischen Gleichgewicht zu tun, wie es sich wohl zuerst Williamson, Clausius und Pfaundler¹⁾ vorgestellt haben. Ist kein Substrat zugegen, welches imstande wäre, die sich abspaltenden H'- und OH'-Ionen aufzunehmen, so vollzieht sich Bildung und Zerfall des Hydrates unbemerkt. Ist dagegen ein Substrat zugegen, welches imstande ist, die Elemente des Wassers auf sich zu fixieren und dabei die als hydrolytische Spaltung bekannte Veränderung zu erfahren, so wäre die erwähnte reversible Aenderung des Aldehyds für die Hydrolyse von größter Bedeutung. Denn hierdurch würden erst dem Substrat die Elemente des Wassers in nennenswerter Weise geliefert, deren es zu seiner Aufspaltung bedarf. Das aldehydische Ferment könnte wie ein Agens wirken, das imstande ist, die Dissoziation des Wassers zu vermehren, eine Wirkung, die den Fermenten schon von Hüfner²⁾, Nencki³⁾ u. a.⁴⁾ zugeschrieben worden

¹⁾ Clark, Glasgow Med. Journ. 63 (1905) 417; Bakt. Zentralbl. 4, 632; Lépine, loc. cit. vorige Fußnote; Loeper u. Ficaï, Archiv med. exp. 19 (1907) 722; Galambos, Magyar Orvosi Archivum [N. F.] 11 (1910) 382; Zentralbl. f. Biochem. 11, 2330; Marino, Deutsches Archiv f. klin. Medizin 103 (1911) 325.

²⁾ Plósz u. Tiegel, Pflügers Archiv 6 (1873) 249, 7 (1873) 391; Enriquez u. Binet, Compt. rend. Soc. Biol. 65 (1908) 577.

³⁾ Williamson, Clausius u. Pfaundler, siehe Allg. Teil S. 483.

⁴⁾ Hüfner, Journ. f. prakt. Chem. [N. F.] 5 (1872) 372.

⁵⁾ Nencki, Siehe die Lehre von den fermentativen Gerinnungserscheinungen, Dorpat 1876; Fehlings Handwörterbuch 3 (1878) 220; siehe auch Walach, Ber. d. chem. Ges. 10 (1877) 2125.

⁶⁾ Vgl. ferner Traube, Theorie der Fermentwirkungen, Berlin 1858; Fehlings Handwörterbuch, loc. cit. vorige Fußnote und die im Allg. Teil, S. 112 u. 113 angeführten Arbeiten von Euler, Kullgren u. a., die eine vermehrte Wasserdissoziation zur Erklärung von Hydratationen, wie derjenigen des Rohr-

ist, ohne daß jedoch Nencki eine andere Erklärung als diejenige einer den Fermenten innewohnenden Fähigkeit, das Wasser in seine Elemente zu zerlegen, herangezogen hätte.

Für die diastatische Wirkung hat nun die Verfasserin eine Anzahl schon im vorigen erwähneter Beobachtungen, auf die hier verwiesen sei, angeführt, die die Annahme stützen, daß es die Aldehydgruppe des Fermentes wäre, welche in der hier skizzierten Weise durch Bildung und nachherigen Zerfall der unbeständigen Hydratform zur Wasserüberträgerin werden könnte. Mit Rücksicht darauf, daß die Verfasserin im Formaldehyd ein einfaches Modell der Peroxydasen gefunden hatte, und daß ferner die Untersuchungen von Grüß¹⁾ — dem eine Trennung von Peroxydase und Diastase auf kapillar-analytischem Wege nicht gelang — diesen Forscher zu der Annahme zurückgeführt hatten, daß die peroxydierende und die diastatische Wirkung am selben Molekül haften, prüfte die Verfasserin, ob man nicht noch durch völlige Identifizierung der wirksamen Gruppen einen Schritt weitergehen könne, als dies Grüß getan hat, — der doch immerhin zwei verschiedene Gruppen des Fermentmoleküls als Trägerinnen der ungleichen Wirkung voraussetzte. Schrieb man aber derselben Gruppe — angenommen, es sei die Aldehydgruppe — diastatische und peroxydierende Funktionen zu, so erschien es möglich, daß ein Peroxydasemodell zugleich Modelleigenschaften der Diastase in ausgeprägterem oder weniger ausgeprägtem Maße erkennen lassen würde. Auf den Formaldehyd übertragen, konnten daher die Methoden der Diastaseermittlung ein positives Resultat ergeben. Dies scheint nun nach dem schon erwähnten Gesamtbild aller zur Anwendung gekommenen Methoden in der Tat der Fall zu sein, wenngleich die hydrolysierende Wirkung des Formaldehyds viel schwächer ausgeprägt ist als die peroxydierende, und wenngleich sie durch Hemmungswirkungen verschiedenster Art gestört wird. Bei abweichender Arbeitsweise konnte dahervon anderer Seite ein positives Resultat bei mehreren Methoden nicht erhalten werden²⁾, während es

zuckers und der Ester, mit herangezogen haben. Hier anzuführen ist auch die im *Allg. Teil*, S. 436 erwähnte Ansicht von Donath, daß die Hydrolyse von Stärke durch Glycerin, durch Wasser im status nascens bewirkt werde, welches sich aus dem Glycerinhydrat abspaltet.

¹⁾ Grüß, Biologie und Kapillaranalyse der Enzyme.

²⁾ Siehe v. Kaufmann, Ber. d. chem. Ges. 50 (1917) 198; v. Kaufmann u. Lewite, Ebenda 52 (1919) 616; Jacoby, Ebenda 52 (1919) 558; Sallinger, Ebenda 52 (1919) 651; Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 94 (1919) 219, 316; vgl. demgegenüber Woker, Ber. d. chem. Ges. 50 (1917) 687; Biochem. Zeitschr.

sich in anderen Fällen lediglich um eine andere Deutungsweise der in Frage kommenden Beobachtungen handelt. So wird die Stärkeverflüssigung wie die Aenderung der Jodstärkereaktion durch Formaldehyd, die zum Auftreten der typischen Joddextrinfärbungen führt, übereinstimmend von allen Forschern bestätigt.

Bei Anwendung der Methode der Dextrinisierung, die zunächst nach der Vorschrift ausgeführt wurde, wie sie Wohlgemuth (loc. cit.) für die Serumdiastase gegeben hat (während bei allen folgenden Versuchen die von Sahli [loc. cit.] empfohlene Methode in Anwendung kam), erhielt die Verfasserin¹⁾ genau dasselbe Bild beim Formaldehyd (der in Verdünnungen des käuflichen 38%igen Formalins von 1—0,1 zur Verwendung gelangte), wie bei dem diastasehaltigen Serum, und zum selben Resultat kamen außer H. Maggi²⁾, der auf ihre Veranlassung das Verhalten des Formaldehyds gegenüber Stärke und Glykogen auf das eingehendste studierte, auch die gegnerischen Autoren³⁾. Das bloße Verschwinden der Stärke-, Jod- resp. der Glykogenjodreaktion⁴⁾ ließe sich auch wohl durch einen andersartigen Vorgang, als durch eine Spaltung, erklären, z. B. durch eine chemische Bindung, eine Möglichkeit, die von den gegnerischen Autoren und früher schon von der Verfasserin selbst ins Auge gefaßt worden ist⁵⁾. Aber hiergegen 99 (1919) 307; Woker u. Maggi, Ber. d. chem. Ges. 52 (1919) 1594; H. Maggi, Fußnote 2, diese Seite.

¹⁾ Woker, Ber. d. chem. Ges. 49 (1916) 2313.

²⁾ H. Maggi, Fermentforschung 2 (1919) 304—448; siehe auch schon Helvetica chimica acta 1 (1918) 445 ff.

³⁾ Loc. cit. Fußnote 2, S. 119.

⁴⁾ Die Glykogenjodreaktion (Rotbraun) zeigt kein völliges Verschwinden, sondern nur eine mehr oder weniger weitgehende Abnahme bzw. einen Uebergang der Färbung in Gelb. Es mag dies zum Teil mit der an und für sich schwachen Wirkung des Formaldehyds, zum Teil mit der Eigenart des Glykogens in Zusammenhang stehen, zu einem nicht mehr weiter spaltbaren achroodextrinartigen Produkt, dem sog. Dystropodextrin abgebaut zu werden, während bei der Säurespaltung auch Erythrodextrin erhalten wird. Die Leberamylase soll ebenfalls etwas Erythrodextrin bilden, wie Tebb, Journ. Physiol. 22 (1898) 427, gefunden hat, und Osborne u. Zobel, Ebenda 29 (1903) 1, fanden ferner Maltose und Isomaltose. Ein wesentlicher Unterschied im Verhalten von Diastase und Formaldehyd gegenüber Glykogen scheint ebensowenig zu bestehen wie gegenüber Stärke. Daß ein Kontrollversuch mit Speichel eine vollständige Entfärbung gibt, beruht nur darauf, daß im Speichel jodbindende Substanzen vorhanden sind. Wie H. Maggi fand, kann man auch dem Formaldehyd die Fähigkeit zur vollständigen Entfärbung der Jodglykogenlösung erteilen, wenn man die Verdünnungen statt mit Wasser mit gekochtem Speichel vornimmt.

⁵⁾ Siehe Woker, Ber. d. chem. Ges. 49 (1916) 2314; v. Kaufmann, Ebenda loc. cit. Fußnote 2, vorige Seite.

spricht, daß die ganze typische Farbenskala der Stärkeabbauprodukte bei der Einwirkung von Formaldehyd auf Stärke erhalten wird und daß das Stärkekorn selbst eine Aenderung der Jodreaktion zeigt entsprechend seiner morphologischen Veränderung — die Punkt für Punkt der Veränderung unter dem Einfluß der Diastase entspricht¹⁾, so daß die Annahme eines Bindungsvorgangs zwischen Formaldehyd und Stärke zugleich die Frage in Fluß bringt, was wir bei der von den nämlichen Farbänderungen begleiteten Einwirkung der Diastase auf Stärke eigentlich beobachten und messend verfolgen. Auch bei der Einwirkung eines Fermentes auf sein Substrat bildet ein Bindungsvorgang aller Wahrscheinlichkeit nach die erste Phase und könnte also mit demselben Recht, wie man dies für den Formaldehyd angenommen hat, mit dem Farbwechsel in Beziehung gebracht werden. Zum mindesten könnte nicht gesagt werden, ob und in welchem Maße bei der Einwirkung von Diastase auf Stärke das Auftreten wirklicher Dextrine oder bloßer Stärkediastaseverbindungen am Zustandekommen der charakteristischen Farbenbilder beteiligt ist. Durch diese Unsicherheit hinge aber die ganze Praxis der Diastasebestimmung auf dieser Basis in der Luft, und die vielen im folgenden angegebenen Arbeiten, die insbesondere mit Hilfe der Methode von Wohlgemuth ausgeführt worden sind, würden dann zu keinerlei Schlußfolgerungen in bezug auf den Diastasegehalt bzw. die diastatische Wirksamkeit der untersuchten Objekte berechtigen. Zum Glück für seine eigene Methode sind jedoch bisher keine Gründe, weder von Wohlgemuth selbst, noch von anderer Seite vorgebracht worden, die uns zwingen würden, von der einfachen Vorstellung abzugehen, daß in jedem Fall — also auch bei der Einwirkung von Formaldehyd auf Stärke — beobachtete Dextrinfärbungen auf dem wirklichen Gehalt eines Reaktionsgemisches an Dextrinen beruhen.

Eine Erklärung des Auftretens der Joddextrinfärbungen wie auch der Dialysierfähigkeit durch Aenderungen des Dispersitätsgrades, wie dies v. Kaufmann (loc. cit.) anzunehmen geneigt ist, führt selbst zu der Auffassung eines Abbaus zurück, da ja gerade die Aenderung des Dispersitätsgrades, welchen schon W. Harrison²⁾ mit der Jodfärbung der Amylosen in Zusammenhang gebracht hat, ein wesentliches Kriterium für den Abbau darstellt, das unter anderem Samec (loc. cit.) zur Beurteilung der diastatischen Stärkespaltung verwendet

¹⁾ Sprünge, Arrosionen und tiefergreifende Auflösungserscheinungen.

²⁾ W. Harrison, Zeitschr. f. Kolloide 9 (1911) 5.

hat. Gerade die erweiterte Kenntnis des Stärkeabbaus, die wir den schon erwähnten Arbeiten Samecs verdanken, zeigt unverkennbar den großen Parallelismus zwischen der Einwirkung der Diastase und des Formaldehyds auf das „Stärkemolat“. Man könnte sich, bevor auf der ganzen Linie dieselben Untersuchungsmethoden in Anwendung gekommen sind, höchstens darüber streiten, ob die Verkleinerung des Moleküls, [die schon durch Wasser allein (entsprechend den Vorstellungen Lintners über die Dextrinnatur der löslichen Stärke) bei höherer Temperatur eine weitgehende, durch Samec von Fall zu Fall dem Grad nach genau bestimmte ist], zunächst an der nach Samec in der nativen Stärke vorliegenden Esterbindung zwischen Amylose und Phosphorsäure angreift, oder wie bei der diastatischen Spaltung an den Bindungen zwischen den Kohlenhydratkomplexen einsetzt. Die Jodreaktion spricht für die letztere Annahme; doch werden erst Phosphatbestimmungen und die Ermittlung der elektrischen Leitfähigkeit vor einer Entscheidung zu Rate gezogen werden müssen, da die Leitfähigkeit der Stärkelösungen, wie Samec angibt, parallel der sich abspaltenden Phosphorsäure ansteigt. Wie aber auch diese Bestimmungen ausfallen mögen, an der Annahme einer beschleunigten Spaltung des Stärkemolates auf den in Betracht fallenden Reaktionsbahnen durch den als Wasserüberträger fungierenden Formaldehyd¹⁾ werden sie kaum etwas zu ändern vermögen.

Selbst die minime (Maggi, loc. cit.) oder fehlende polarimetrische Aenderung (v. Kaufmann, Sallinger, loc. cit.) von Formaldehyd-Stärkegemischen hat durch die Feststellung von Samec, daß eine solche Aenderung erst bei relativ weit vorgeschrittener diastatischer Spaltung in die Erscheinung tritt, die einfachste Erklärung²⁾ gefunden; denn daß die Spaltung der Stärke durch Formaldehyd sehr unvollständig ist, wurde nie bezweifelt. Das geringe Reduktionsvermögen und die übrigen schwach ausgeprägten Zuckerreaktionen, welche H. Maggi und die Verfasserin im Gegensatz zu anderen Autoren (v. Kaufmann, Sallinger) feststellten, läßt sich vollständig mittels der Auffassung von Moreau (loc. cit. im folgenden), v. Friedrichs³⁾

¹⁾ Ueber eine andere Wirkungsweise siehe Anhang.

²⁾ Ferner wäre daran zu denken, daß bei dem asymmetrischen natürlichen Ferment eine weit stärkere Beeinflussung der optischen Drehung durch die Bildung der Rechts- oder Linksformen der asymmetrischen Spaltprodukte zu erwarten ist, als bei dem zu Razemformen führenden optisch indifferenten, nicht asymmetrischen Formaldehyd.

³⁾ v. Friedrichs, Arkiv f. Kemi, Min. och Geol. 5 (1913) 46.

und Samec (loc. cit.) über eine schon in den Anfangsstadien des Stärkeabbaus einsetzende Zuckerabspaltung aus dem Stärkemolekül erklären. Die Hauptmenge würde dagegen als nicht weiter spaltbares Dextrin oder Reversionsdextrin übrig bleiben.

Da die Wirkung des Formaldehyds abnimmt nach Maßgabe seiner Oxydation zu Ameisensäure, welche die Reaktion nicht zu geben vermag, ja sogar im Gegenteil durch ihre Azidität hemmend wirkt¹⁾, so könnte z. B. die von Wohlgemuth (loc. cit.) zur Diastasebestimmung vorgeschlagene Methode oder diejenige von Sahli (loc. cit.) zur Prüfung des Reinheitsgrades von Formalinlösungen dienen. Für die Ermittlung des Formaldehyds in irgendwelchen Flüssigkeiten ist dagegen die Methode — im Gegensatz zu dem sehr gut analytisch zu verwertenden Peroxydaseeffekt dieser Substanz — zu wenig empfindlich. Eine Spaltung, die das Bild der Achroodextrinstufe ergibt, ist nur mit sehr hohen Konzentrationen möglich: die 4–5fache Verdünnung des Formalins liefert in der Hauptsache das Farbenbild der mit Jod unter intensiver Rotfärbung reagierenden Erythrodextrine, und geringere Konzentrationen bedingen nur eine mehr oder weniger starke Aenderung der blauen Jodstärkereaktion nach Violett²⁾. Ob diese Aenderung einer Mischfarbe der Jodstärkereaktion und der Joderythrodextrinreaktion zuzuschreiben ist, oder ob sie auf der Bildung eines selbständigen Individuums, dem Amylodextrin, beruht, ist schwer zu entscheiden. Nach Brown und Morris³⁾ wird das auch bei der Säurespaltung⁴⁾ aufgefundene Amylodextrin⁵⁾ als ein selbständiges Individuum betrachtet, während es Lintner in Zusammenhang mit dem als lösliche Stärke bezeichneten Produkte bringt. Dabei ist jedoch der Begriff der löslichen Stärke ebensowenig abgeklärt. Musculus und Gruber⁶⁾ haben sie den Dextrinen zugerechnet, wie sich auch schon

¹⁾ Hierdurch wird der Einwand entkräftet, daß die Wasserstoffionen der Ameisensäure eine gewöhnliche Säurespaltung des Polysaccharids veranlaßt hätten, die eine Wirkung des Formaldehyds nur vortäuschen würde.

²⁾ Auch das Amylopektin ist trotz seiner höhermolekularen Natur durch eine violette Farbenreaktion mit Jod ausgezeichnet (Samec).

³⁾ Brown u. Morris, Zeitschr. f. ges. Brauwesen (1889) 437; Journ. Chem. Soc. London 55 (1889) 449.

⁴⁾ Siehe schon Nägeli, Ann. Chem. 173 (1874) 218.

⁵⁾ Nach Brown u. Morris, loc. cit. Fußnote 3, diese Seite, käme dem Amylodextrin die Formel zu $(C_{12}H_{10}O_{10})_6C_{12}H_{22}O_{11}$. Ueber die Reinigung und Identifizierung von Amylodextrin durch das Nitrat siehe ferner Brown u. Millar, Journ. Chem. Soc. London 75 (1899) 311.

⁶⁾ Musculus u. Gruber, Zeitschr. f. physiol. Chem. 2 (1878) 188.

viel früher Biot zuerst des Namens Dextrin für einen Stoff dieser Art bedient hat. Bondonneau¹⁾ dagegen zählt die lösliche Stärke der Stärke zu.

Auf alle Fälle handelt es sich, wie aus den exakten, alle möglichen Merkmale berücksichtigenden Untersuchungen von Samec und Jencic²⁾, wie auch Samec und v. Hoefft³⁾ hervorgeht, um die allerverschiedenartigsten Produkte. Je nach der Vorbehandlung, die meist in einem Erhitzen der wäßrigen Stärkesuspension unter Druck auf Temperaturen von 120°, 135°, 150° und noch höher besteht⁴⁾ (wobei der Hitzeeinwirkung eine mehr oder weniger eingreifende Behandlung mit verdünnter kalter Salzsäure vorausgehen kann⁵⁾), sind sie als Gemisch⁶⁾ höher oder niedriger molekularer Abbauprodukte der Stärke zu betrachten. Mindestens hat eine Abspaltung des Phosphorsäurerestes aus dem Amylopektin stattgefunden.

Bondonneau (loc. cit.) wie auch Lintner und Düll⁷⁾ nahmen

¹⁾ Bondonneau, Bull. Soc. Chim. 23 (1875) 98; Compt. rend. 81 (1875) 972, 1210.

²⁾ Samec u. Jencic, Kolloidchem. Beihefte 7 (1915) 150 ff.

³⁾ Samec u. v. Hoefft, Kolloidchem. Beihefte 5 (1913) 171.

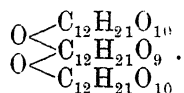
⁴⁾ Es kann die Stärke auch durch trockenes Erhitzen auf 130–150° in lösliche Spaltprodukte übergeführt werden (Röstgummi), und teilweise gelingt dies, wie Wolff u. Fernbach, Compt. rend. 140 (1905) 1403, sowie Malfitano u. Moschkoff, Ebenda 154 (1912) 443, gezeigt haben, auch durch Austrocknen der Stärke bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum. Nach Zulkowski, Ber. d. chem. Ges. 13 (1880) 1398, wird lösliche Stärke durch Erhitzen mit Glycerin auf 190° dargestellt. Doch würde hierbei nach Donath (loc. cit.) das Hydratwasser für die Hydrolyse eine Rolle spielen. Bei der Methode von Malfitano u. Moschkoff, Compt. rend. 150 (1910) 710, 151 (1910) 817, wird durch öfter wiederholtes abwechselndes Gefrieren und Auftauen gleichsam ein Verwitterungsprozeß der Stärke erzielt, der ebenfalls zu löslichen Produkten führt, die elektrolytfrei sind. Anderer Art ist auch die Methode, deren sich v. Syniewski, Ber. d. chem. Ges. 30 (1897) 2415, bedient, um mittels Natriumsuperoxyd in der Kälte eine lösliche Stärke zu erhalten. Vielleicht ist all diesen ganz verschiedenen Verfahren eine mechanische Komponente gemeinsam, welche die Stärkemoleküle, sei es durch Dampfwirkung in den feinsten Interstitien der Molekülaggregate (in den zwischenmolekularen Räumen) oder durch Sauerstoffentwicklung in denselben bei der Peroxydmethode, oder durch Gefrieren des eingeschlossenen Wassers auseinanderprengt, worauf erst die weitere spaltende Wirkung, sei es an der Phosphorsäureesterbindung, sei es an den Bindungen der Kohlenhydratkomplexe untereinander, einsetzen kann.

⁵⁾ Bei der Herstellung der löslichen Stärke nach Lintner, Journ. f. prakt. Chem. 34 (1886) 378; Wolff u. Fernbach, Compt. rend. 140 (1905) 1403.

⁶⁾ Siehe auch C. Tauret, Compt. rend. 148 (1909) 1775.

⁷⁾ Lintner u. Düll, Ber. d. chem. Ges. 26 (1893) 2533.

drei Dextrine (Amylo-, Erythro- und Achroodextrin) an. Die Annahme einer Achroo-¹⁾ und einer Erythrodextrinstufe, auf die im vorigen abgestellt wurde, ist zuerst von Brücke²⁾ vertreten worden. Wie weit es sich hier um einheitliche Körper, oder um Gemische verschiedener Spaltprodukte handelt, ist wiederum eine neue Frage. Musculus und Gruber (loc. cit.) unterscheiden ein α -, β - und γ -Achroodextrin, Brown und Millar³⁾ betrachten das Achroodextrin als einheitlich⁴⁾, Lintner und Düll⁵⁾ nehmen wiederum ein von jenen verschiedenes Achroodextrin an, dem sie die spezifische Drehung 183° , ein Reduktionsvermögen, das 27% der Maltose beträgt und die Zusammensetzung $(C_{12}H_{20}O_{10})_2C_{12}H_{22}O_{11}$ zuschreiben. Wiederum anderer Art ist das von Moreau⁶⁾ durch Barytfällung isolierte Achroodextrin, dem gar keine Reduktionskraft zukommt, die dieser Forscher vielmehr, wo sie bei Achroo- oder Erythro- oder überhaupt bei irgendwelchen Dextrinen auftritt, als die Folge einer Verunreinigung mit Zuckern betrachtet. Außer den genannten Dextrinen ist von Herzfeld⁷⁾, Brown und Morris⁸⁾ die Existenz eines sog. Maltodextrins in den Spaltgemischen behauptet und der Verbindung die folgende Konstitution zugeschrieben worden:



Schiffener⁹⁾ ist jedoch der Ansicht, daß es sich hier um eine unreine Isomaltose handelt, die neben Maltose in den diastatischen Stärkespaltgemischen auftritt. Was die Aufeinanderfolge der dextrinartigen Produkte, gleichviel welcher Art und wie zahlreich sie seien, betrifft, so war die ursprüngliche Annahme die einer fortgesetzten

¹⁾ Nasse, Pflügers Archiv **14** (1877) 477, bezeichnet ein dieser Stufe entsprechendes Abbauprodukt als Dextrinogen.

²⁾ Brücke, Wiener akad. Ber., math.-physik. Kl. **3** (1872) 126.

³⁾ Brown u. Millar, Journ. Chem. Soc. London **75** (1899) 315.

⁴⁾ Es besitzt eine spezifische Drehung von $197-198^\circ$ und ein Reduktionsvermögen von 5,5% und ist dank einer freien Aldehydgruppe zum Uebergang in eine Säure, die sog. Dextrinsäure, befähigt, welche aus 40 Traubenzuckermolekülen unter Austritt von 39 Wassermolekülen entstehen soll.

⁵⁾ Lintner u. Düll, Zeitschr. f. ges. Brauwesen (1894) 339.

⁶⁾ Moreau, Ann. de la Soc. Royal des sciences méd. et nat. de Bruxelles, Jahrg. **64**, **12**, fasc. 3.

⁷⁾ Herzfeld, Ueber Maltodextrin, Inaug.-Dissert., Halle 1879.

⁸⁾ Brown u. Morris, Journ. Chem. Soc. London **47** (1885) 527.

⁹⁾ Schiffener, Die nicht kristallisierbaren Produkte der Einwirkung von Diastase auf Stärke, Inaug.-Dissert., Basel 1892.

Hydrolyse zu Dextrinen von immer geringerem Molekulargewicht. Dieser Auffassung würde die Theorie von Brown und Heron¹⁾ entsprechen, wonach sich zunächst aus der löslichen Stärke, der sie die Formel $(C_{12}H_{20}O_{10})_{10}$ zuschreiben, 1 Molekül Maltose abspaltet. Der restierende Komplex würde das Erythrodextrin repräsentieren, das nun in gleicher Weise sukzessive unter Abspaltung von je 1 Molekül Maltose in das nächstniedrige Dextrin übergeht. Bei der achten Hydrolyse wäre bei einer Zusammensetzung des Reaktionsgemisches von 81% Maltose und 19% Achroodextrin das einfachste Dextrin dieser Stufe (und damit der Dextrine überhaupt) erreicht. Auch die Ansicht ist von Brown und Morris²⁾ vertreten worden, daß das Molekül löslicher Stärke aus fünf gleichen Achroodextrinkernen $(C_{12}H_{20}O_{10})_{20}$ zusammengesetzt sei und in diese Achroodextrinelemente bei der Aufspaltung zerfalle, wobei sog. „Amyloine“ (Verbindungen von „Amylin-kernen“, $C_{12}H_{20}O_{10}$, und „Amylonkernen“, $C_{12}H_{22}O_{11}$, als Zwischenprodukte durchlaufen werden sollen. Lintner und Düll³⁾ halten jedoch die Amyloine nur für Dextrin-Isomaltosegemische. Das komplizierteste, im folgenden (S. 127) angegebene Abbauschema ist in Ergänzung desjenigen von Moreau⁴⁾ von Samec (loc. cit.) aufgestellt worden (s. demgegenüber die Ausführungen im Anhang).

Das Schema von Samec soll sowohl der Annahme einer sukzessiven Bildung immer einfacherer Produkte (Stärke, Amylodextrin — Erythrodextrin, Achroodextrin, Zucker) wie der Annahme ihres gleichzeitigen Auftretens Rechnung tragen.

So variierend auch im einzelnen die Auffassungen sind, die hinsichtlich des Stärkeabbaus unwiderlegt, aber auch unbewiesen nebeneinander bestanden, so waren es im Gebiet der Dextrine doch immer dieselben Hauptabbaustufen, welche, namentlich durch die ungleiche Farbenreaktion mit Jod, die Aufmerksamkeit der verschiedensten Forscher auf sich gezogen haben. Pringsheim und Langhans⁵⁾, welche, anknüpfend an die Feststellung von Schardinger⁶⁾, daß ge-

¹⁾ Brown u. Heron, Ann. Chem. 199 (1880) 247; Journ. Chem. Soc. London 35 (1879) 596.

²⁾ Brown u. Morris, Journ. Chem. Soc. London 55 (1889) 462. 69 (1895) 709.

³⁾ Lintner u. Düll, Ber. d. chem. Ges. 26 (1893) 2533.

⁴⁾ Moreau, loc. cit. u. Wochenschr. f. Brauerei 22, Nr. 315.

⁵⁾ Pringsheim u. Langhans, Ebenda 45 (1912) 2533.

⁶⁾ Schardinger, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 6 (1903) 874; Wiener klin. Wochenschr. (1904) Nr. 8; Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde. 2. Abteil. 14 (1905) 772, 19 (1907) 161, 22 (1909) 98, 29 (1911) 188.

Abbauzeit	Stärke: M = 117 000		
3 Minuten	Kolloider Rest M = 106 000 blaue Jodfarbe keine Asymmetrieänderung ↓	+	Amylodextrin M < 2000 blaue Jodfarbe Reduktionsvermögen keine Asymmetrieänderung ↓
10 Minuten	Kolloider Rest M = 72 000 blaue Jodfarbe keine Asymmetrieänderung ↓	+	Amylodextrin M < 2000 blaue Jodfarbe Reduktionsvermögen keine Asymmetrieänd. ↓
30 Minuten	Kolloid. Rest M = 26 000 blaue Jodfarbe ↓	+	Amylodextr. M < 2000 blaue Jodfarbe Reduktionsvermögen keine Asymmetrieänd. ↓
1 Stunde	Kolloider Rest M = 19 000 blaue Jodfarbe ↓	+	Erythroextr. + Zucker rote Jodfarbe Reduktionsvermögen Symmetrieänderung ↓
2 Stunden	Kolloider Rest M = 11 400 blaue Jodfarbe ↓	+	Achroodextrin + Zucker keine Jodfarbe geringe Symmetrieänderung Reduktionsvermögen ↓
4 Stunden	Kolloider Rest M = 9 160 blaue Jodfarbe	+	Achroodextrin keine Jodfarbe geringe Symmetrieänderung

wisse Bakterien (namentlich der von dem letzteren Forscher entdeckte Rottebazillus, *Bacillus macerans*) kristallisierte Dextrine aus Stärke zu bilden vermögen, auf die ringförmige Konstitution dieser Körper hinwiesen, haben die Ansicht vertreten, daß auch die Stärke Ringstruktur besitzt. Dieselbe sei in den Dextrinen noch intakt vorhanden und bedürfe besonderer Fermente zu ihrer Aufspaltung zu Zucker, welches letzterer, wie schon Dubrunfaut¹⁾ gefunden hatte und nach ihm O'Sullivan²⁾, Schulze³⁾ und Maercker⁴⁾ aufs neue feststellten, als Maltose anzusprechen ist. Danach würde also, entsprechend der schon früher erwähnten Zweienzymtheorie, die Diastase ein System zweier in ihrer Wirkung hintereinandergeschalteter Enzyme darstellen, deren eines Stärke in Dextrine, das andere Dextrine in Zucker verwandelt, eine Auffassung, die im Anhang näher beleuchtet ist.

¹⁾ Dubrunfaut, Ann. Chim. Physique [3] 21 (1847) 178.

²⁾ O'Sullivan, Journ. Chem. Soc. London (1876) II, 125.

³⁾ Schulze, Ber. d. chem. Ges. 7 (1874) 1047.

⁴⁾ Maercker, Landwirtsch. Jahrbücher, 1877, Supplementheft, S. 286.

Eine Entscheidung über die Frage, ob die Zweienzymtheorie oder die Auffassung einer einheitlichen Diastase den Tatsachen entspricht, wird jedoch erst dann möglich sein, wenn systematisch in jedem Fall, wo eine Flüssigkeit oder ein Extrakt des tierischen oder pflanzlichen Organismus oder Myxomyceten ¹⁾, Bakterien ²⁾, Pilze ³⁾ usw. auf das Vorkommen von Diastase geprüft werden, sowohl das Dextrinisierungs- wie das Verzuckerungsvermögen zur Untersuchung gelangt. Jeder experimentelle Befund einer nur die eine oder nur die andere Fähigkeit zeigenden Diastasewirkung bildet dann eine Stütze der Zweienzymtheorie. Bisher findet sich außer den schon erwähnten Gründen, die von den Vertretern derselben angeführt wurden, in der Literatur eine nach dieser Richtung zu verwertende Angabe von Tschernorowski ⁴⁾, der bei der Einwirkung von Nukleinsäure auf den Organismus eine enorme Steigerung der an Hand der Jodreaktion fest-

¹⁾ Wortmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 6 (1882) 324; Schroeder, Hofmeisters Beitr. 4 (1907) 153.

²⁾ Wortmann, loc. cit. vorige Fußnote; Fermi, loc. cit. folgende Fußnote; Bitter, Archiv f. Hygiene 5 (1886) 241; Fuhrmann, Bakterienenzyme, Jena 1907; Kruse, Allg. Mikrobiologie, Leipzig 1910.

³⁾ Z. B. Fermi, Archiv f. Hygiene 10 (1890) 1; Zentralbl. f. Bakt. 12 (1892) 713; Zellner, Sitzungsber. d. Wiener Akad., Abt. IIb, 118, 3; Monatshefte f. Chem. 27 (1906/07) 281; Chemie der höheren Pilze, Leipzig 1907; Laffar, IV, 424; Buchner u. Rapp, Ber. d. chem. Ges. 31 (1898) 209; Went, Jahrb. f. wissenschaft. Bot. 36 (1901) 611; Henneberg, Zeitschr. f. Spiritusind. 25 (1902) 373, 553; vgl. auch Harden u. Paine, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 84 (1912) 448; Buller, Ann. Bot. 20 (1906) 49; Dox, Journ. Biol. Chem. 6 (1909) 461; U. S. Dep. Agricult. Bur. of animal Ind. (1910): Bull. Nr. 120, 1.

Ueber Takadiastase, die Diastase des *Aspergillus Oryzae*, der mit der Kojihefe, welche den gebildeten Zucker vergärt, in Symbiose lebt (echte Hefen liefern keine Diastase, wenigstens nicht als Exoenzym), siehe Atkinson, Trans. Chem. Soc. 40 (1881) 1659; Büsgen, Ber. d. bot. Ges. 3 (1885) LXVI; Kellner, Mori u. Nagaoka, Zeitschr. f. physiol. Chem. 14 (1896) 297; Wingrave, Lancet (1898) I, 1251; Takamine, Journ. Soc. Chem. Ind. 17 (1898) 118; Stone u. Wright, Journ. Amer. Chem. Soc. 20 (1899) 637; Saito, Zentralbl. f. Bakt. [2] 17 (1906), Heft 1—7; Wochenschr. f. Brauerei 27 (1910) 181; Mänter, Landwirtschaft. Jahrbücher 39, Ergänzungsband III (1910) 298; Kita, Zentralbl. f. Biochemie 14 (1913) 813; Wochenschr. f. Brauerei 29 (1912) 460; Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 39 (1912) 324. Auch bei der tonkinesischen Hefe liegt Symbiose eines diastasebildenden Schimmelpilzes (*Amylomyces Rouxii*) und eines *Saccharomyces* (*Sacch. pastorianus*) vor; siehe Calmette, Ann. Inst. Pasteur 6 (1892) 604; Sanguinetti, Ebenda 11 (1897) 264.

⁴⁾ Tschernorowski, Biochem. Zeitschr. 36 (1911) 363. Ueber den Diastasegehalt der Lunge siehe auch Nadina Sieber u. Dzierzowski, Zeitschrift f. physiol. Chem. 62 (1909) 263.

gestellten Dextrinisierung unter dem Einfluß von Organdiastase (Lunge, Gehirn) feststellen konnte, während eine Erhöhung des Verzuckerungsvermögens derselben Organe nicht zu konstatieren war, und ferner die Feststellung, daß *Bacterium amylobakter* die Stärke nur bis zu Dextrinen spaltet, während andere nur Dextrine angreifen.

Siehe außer der schon erwähnten Literatur über das Vorkommen der Diastase:

Astaschewski, *Zentralbl. f. d. med. Wissensch.* (1877) 531; Ellenberger, *Archiv f. wissenschaftl. Tierheilkunde* 8 (1882) 233, 12 (1886) 322; Hamburger, *Archiv f. d. ges. Physiol.* 60 (1895) 545 (Speicheldiastase).¹

Bouchardat u. Sandras, *Compt. rend.* 20 (1845) 1085; Roberts, *Proc. Royal Soc. London* [Ser. B] 32 (1881) 145; Dahl, *Die Pankreasfermente bei Rinder- und Schafsföten*, Dissert., Dorpat 1890; *Zentralbl. f. Physiol.* (1891) 309; Floresco, *Compt. rend. de la Soc. de Biol.* 48 (1896) 77 (Pankreasdiastase); Paschutin, *Archiv f. Anat. u. Physiol.* (1871) 305; Lannois u. Lépine, *Arch. de Physiol.* 1 (1883) 92; Brown u. Heron, *Ann. Chem.* 204 (1880) 228; Röhmann, *Archiv f. d. ges. Physiol.* 41 (1887) 424; Grünert, *Zentralbl. f. Physiol.* 5 (1892) 285; Tebb, *Journ. Physiol.* 15 (1893) 42; Pregl, *Archiv f. d. ges. Physiol.* 61 (1895) 388; Mendel, *Ebenda* 63 (1896) 425; Nagano, *Mitteil. ab. Grenzgeb. d. Med. u. Chir.* 9 (1902) 393; Bierry u. Frouin, *Compt. rend.* 142 (1906) 1565; Loeper u. Esmonet, *Compt. rend. de la Soc. de Biol.* 65 (1908) 188, 310, 445, 585, 850, 939, 996; Wasserthal, *Archiv f. Verdauungskrankheiten* 16 (1910) 447; Wakabayashi u. Wohlgemuth, *Internat. Beitr. z. Pathol. d. Ernährung* 2, Heft 4 (Diastase im Darmsaft von Warmblütern).

Hemmeter, *Archiv f. d. ges. Physiol.* 81 (1900) 151; Esser, *Deutsches Archiv f. klin. Med.* 93 (1908) 535 (Diastase im Dickdarmsekret).⁴

Hoppe-Seyler, *Archiv f. d. ges. Physiol.* 14 (1877) 394; Krukenberg, *Unters. d. physiol. Inst. Heidelberg* 2 (1882) 75, 411; Biedermann u. Moritz, *Archiv f. d. ges. Physiol.* 73 (1898) 247; Gruner, *Dissert.*, Berlin 1901; Röhmann, *Festschr. f. Salkowski*, Berlin 1904; Petersen, *Archiv f. d. ges. Physiol.* 145 (1912) 121 (Darmdiastase von Kaltblütern).

Langendorff, *Archiv f. Anat. u. Physiol.* (1879) 1; Bial, *Archiv f. d. ges. Physiol.* 53 (1893) 156, 55 (1894) 434; Röhmann, *Ber. d. chem. Ges.* 25 (1892) 3654; *Zentralbl. f. d. med. Wissensch.* (1893) 849; Emil Fischer u. Niebel, *Berliner akad. Ber.* 5 (1896) 71; Nobécourt u. Sevin, *Compt. rend. de la Soc. de Biol.* 53 (1901) 1068; Loewi, *Marburger Sitzungsber.* (1905); Pariset, *Compt. rend. de la Soc. de Biol.* 60 (1906) 644; Manzini, *Arch. di Farm.* 4, Heft 2/3; *Biochem. Zentralbl.* 4 (1905) 534; Loeper u. Ficaï, *Compt. rend. de la Soc. de Biol.* 63 (1907) 266; Carlson u. Luckhardt, *Amer. Journ. Physiol.* 23 (1908) 148; Ehrmann u. Wohlgemuth, *Biochem. Zeitschr.* 21 (1909) 421; Clerc u. Loeper, *Compt. rend. de la Soc. de Biol.* 66 (1909) 871; Moeckel u. Rost, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 67 (1910) 433; Hirata, *Biochem. Zeitschr.* 28 (1910) 23; Starkenstein, *Ebenda* 24 (1910) 191; Schirokauer, *Archiv f. Gynäkol.* 91 (1910) 143; Otten u. Galloway, *Amer. Journ. Physiol.* 26 (1910) 347; Gould u. Carlson, *Ebenda* 29 (1911) 165; Abderhalden u.

Rathsmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **71** (1911) 367 (Blutdiastase von Warmblütern).

Sellier, Compt. rend. de la Soc. de Biol. **56** (1904) 261 (Blutdiastase von Kaltblütern).

Haberlandt, Archiv f. d. ges. Physiol. **132** (1910) 175; Tschernoruzki, Zeitschr. f. physiol. Chem. **75** (1911) 216; Seligmann, Die Fermente der Milch in Sommerfeldts Handbuch der Milchkunde, Wiesbaden 1909; Tanaka, Biochem. Zeitschr. **37** (1911) 249; Béchamps, Compt. rend. **96** (1883) 1508; Zaitschek, Archiv f. d. ges. Physiol. **104** (1905) 539; Wohlgemuth u. Strich, Sitzungsber. d. Berliner Akad. **25** (1910) 520 (Milchdiastase).

Röhmman, Archiv f. d. ges. Physiol. **52** (1892) 157; Röhmman u. Bial, Ebenda **55** (1893) 419 (Diastase der Lymphe).

Panzer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **30** (1900) 113 (Chylusdiastase).

Panzer, Wiener klin. Wochenschr. (1899) 805; Grober, Münchner med. Wochenschr. (1900) 247; Cavazzani, Zentralbl. f. Physiol. **10** (1896) 145, **13** (1900) 437; Kafka, Mitteil. d. Hamburger Staatskrankenanst. **13** (1912) Heft 3; Zentralbl. f. Biochem. **14** (1913) 1044 (Diastase des Liquor cerebrospinalis).

Jacobson, De sacchari formatione, Dissert., Regimonti 1865; Bonnano, Arch. di Farmacol. **7**, Heft 10 (Gallendiastase).

Lépine, Sitzungsber. d. sächs. Akad. d. Wiss. **22** (1870) 322; Leber, Handb. d. ges. Augenheilkunde **2** (1903) 2, 2. Aufl. (Diastase der Augenflüssigkeit).

Béchamps, Compt. rend. **60** (1865) 445; Béchamps u. Baltus, Ebenda **90** (1880) 373, 539; Holovtschiner, Virchows Archiv **104** (1886) 42; Breusing, Ebenda **107** (1887) 1861; Lemaire, Compt. rend. de la Soc. de Biol. **55** (1903) 1446; Pariset, Ebenda **63** (1907) 614; Nigay, Ebenda **64** (1908) 793; Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. **21** (1909) 432; Berliner klin. Wochenschr. (1910) Nr. 31; Zeitschr. f. Urol. **5** (1911) 801; Schaumberg, Dissert., Marburg 1910; Rosenthal, Deutsche med. Wochenschr. **37** (1911) 923; Lindemann, Zeitschr. f. klin. Med. **75** (1912) 58 (Harndiastase).

Friedenthal, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1899) Suppl. 383; Southall u. Haycraft, Journ. Anat. and Physiol. **23**, 452; Wohlgemuth, Biochem. Zeitschrift **9** (1908) 10 (Diastase im Magensaft; Angaben widersprechend).

Gaube, Compt. rend. de la Soc. de Biol. **43** (1891) 115 (Diastase im Schweiß).

Bondi, Zentralbl. f. Gynäkol. (1903) 633 (Diastase im Fruchtwasser).

Eichhorst, Zeitschr. f. klin. Med. **3** (1881) 537; Lühje, Festschr. f. J. Rosenthal, 1905 (Diastase in Exsudaten).

Claude Bernard, Compt. rend. **41** (1855) 461, **84** (1877) 519; v. Wittich, Archiv f. d. ges. Physiol. **7** (1873) 28; Seegen u. Kratschmer, Ebenda **14** (1877) 593; Seegen, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1903) Suppl.-Bd. 425; Bial, Archiv f. d. ges. Physiol. **52** (1892) 137; Pick, Hofmeisters Beitr. **3** (1902) 63; Permillieux, Compt. rend. de la Soc. de Biol. **53** (1902) 32; Dastre, Ebenda **53** (1902) 34; Borchardt, Archiv f. d. ges. Physiol. **100** (1903) 259; Schöndorff u. Victoroff, Ebenda **116** (1907) 495; Mendel u. Saiki, Amer. Journ. Physiol. **21** (1908) 64; Pugliese u. Domenichini, Arch. di Farm. **12** (1907) Heft 4; Biochem. Zentralbl. **7** (1907/08) 533; Piccioli, Arch. di Farm. **14**, 255; Arch. ital. Biol. **50** (1909) 282; Schirokauer u. Wilenko, Biochem. Zeitschrift **33** (1911) 275 (Leberdiastase).

Kisch, Hofmeisters Beitr. 8 (1906) 210; Maignon, Compt. rend. 145 (1907) 730; Ransom, Journ. Physiol. 42 (1911) 144 (Muskeldiastase).

Berblinger, Zieglers Beitr. f. pathol. Anat. 53 (1912) 155 (Diastase des Herzmuskels).

Battesti u. Barraja, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 55 (1903) 820; Wohlgemuth u. Benzur, Biochem. Zeitschr. 21 (1909) 460 (Nierendiastase).

Croftan, Archiv f. d. ges. Physiol. 90 (1902) 285 (Nebennierendiastase).

Wroblewski, Compt. rend. 152 (1911) 1334; Tschernoruzki, loc. cit. (Gehirndiastase).

Mancini, Biochem. Zeitschr. 26 (1910) 140 (Milzdiastase).

Joh. Müller, Münchner med. Wochenschr. (1899) 1583; Joh. Müller u. Masuyama, Zeitschr. f. Biol. 29 (1900) 547; Wohlgemuth, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44 (1905) 540; Herlitzka, Biologica I, 1; Arch. Ital. Biol. 48 (1907) 119; Roger, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 64 (1908) 1137; Journ. de Physiol. et de Pathol. gén. 10 (1908) 797; s. auch Gayon, Thèse de Paris, 1875 (Diastase im Hühnerei).

Hein, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 44 (1892) 467 (Diastase in Crustaceeneiern).

W. Löb u. Gutmann, Biochem. Zeitschr. 41 (1912) 445 (Diastase in Ovarien).

Bergell u. Liepmann, Münchner med. Wochenschr. (1905) 2311; Savaré, Hofmeisters Beitr. 9 (1907) 141; Cramer u. Lochhead, Journ. Physiol. 34 (1906) XXIV; Nattau-Larrier u. Ficai, Journ. de Physiol. et de Pathol. gén. 10 (1908) 60; Löb u. Higuchi, Biochem. Zeitschr. 22 (1909) 316, 337 (Plazentadiastase).

Langendorff, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1879) 95; Mendel u. Mitchell, Amer. Journ. Physiol. 20 (1907) 81; Ibrahim, Zeitschr. f. physiol. Chem. 66 (1910) 19 (Diastase in Embryonen).

Buxton u. Shaffer, Journ. med. Research 9, 356. 13 (1904) 543 (Tumordiastasen).

v. Fürth, Chem. Physiol. d. niederen Tiere, 1902; Pinoy, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 58 (1905) 769; Schulz, Verdauungsdrüsen niederer Tiere, in Oppenheimers Handb. d. Biochem. 3, 1, Jena 1909; Weinland, Verdauung der Wirbellosen, Ebenda 3, 2, Jena 1909 (Diastasen bei niederen Tieren).

Brown u. Morris, Journ. Chem. Soc. London 57 (1890) 493; Pfeffer, Ber. d. kgl. sächs. Akad. (1893) 422; Linz, Jahrb. f. wissenschaft. Bot. 29 (1896) 267; Puriewitsch, Ebenda 31 (1898) 1; White, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 81 (1909) 417; Babcock, Univ. Wisconsin Agricult. Exp. Stat. Bull. 22 (1912); Grüß, loc. cit. (Samendiastase).

Kammann, Biochem. Zeitschr. 46 (1912) 151 (Pollendiastase).

Brown u. Morris, Journ. Chem. Soc. London 63 (1893) 604; A. Mayer, Chem. Zentralbl. (1900) I. 824 (Blätterdiastase).

Zytase (Zellulase) und verwandte Fermente. Im Anschluß an die Diastase sei noch einiger weiterer Polysaccharasen Erwähnung getan, die, entsprechend den engen verwandtschaftlichen Beziehungen der höheren Kohlenhydrate, miteinander und mit der Diastase in ge-

wissem Zusammenhang stehen¹⁾. Das zellwandaufspaltende Enzym, die Zellulase oder Zytase, sowie das sog. Gummiferment²⁾ werden von einigen Forschern direkt als Diastase betrachtet³⁾. Gegen diese Identifizierung spricht allerdings, daß Newcombe⁴⁾ bei der Zytase aus Dattelendosperm und einem zytolytischen Enzym⁵⁾ aus *Aspergillus Oryzae*⁶⁾ eine viel stärkere Wirkung auf Zellulose als auf Stärke konstatierte, daß Brown und Morris⁷⁾ bei keimender Gerste eine frühere Auflösung der Zellwände als der Stärkekörner feststellten und daß dieselben Forscher zeigten, daß durch Erhitzen des durch Fällen mit Alkohol aus den wäßrigen Extrakten gewonnene zytolytische Enzym bei 60° seine Fähigkeit, auf Zellulose einzuwirken, verliert, während es gegenüber Stärke noch wirksam bleibt⁸⁾. Doch ließen sich diese Tatsachen im wesentlichen auch durch die spezifische Einstellung einer Diastase auf ein besonderes Substrat, wie die Zellulose, deuten, so daß zwischen den gewöhnlichen Diastasen und der Zytase eine Beziehung bestünde analog derjenigen zwischen den proteolytischen Fermenten des Blutes und den spezifischen Immunkörpern, welche sich erst durch besondere Einstellung auf in die Blutbahn gelangendes blutfremdes Eiweiß bilden⁹⁾. Dasselbe gilt für ein anderes, zuerst von Effront¹⁰⁾ in den keimenden Samen des Johannisbrotbaumes *Ceratonia siliqua* aufgefundenes, das Carubin dieser Samen aufspaltendes Enzym, die Seminase (Carubinase), und ähnliche bei der Keimung

¹⁾ Siehe hierüber den Anhang.

²⁾ Dieses von Wiesner, Wien. Akad. 92 (1886) I, 40, aufgefundene Enzym wandelt Zellulose in Gummi oder Schleim um.

³⁾ Größ, Ber. d. bot. Ges. 12 (1894), Sitzungsber. S. 60; Beitr. z. Enzymologie, Festschr. f. Schwendener, Berlin 1899, S. 184; Reinitzer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 14 (1889) 453, 23 (1897) 175, 61 (1909) 352.

⁴⁾ Newcombe, Ann. of Bot. 13 (1899) 49.

⁵⁾ Schellenberg, Flora 98 (1908) 257, hat die zytolytischen Enzyme der Pilze untersucht und unterscheidet vier Fermente, die sich gegenüber Hemicellulosen ungleich verhalten: die Lupinuszytase, die Moliniazytase, die Impatienszytase und die Phönixzytase. Schellenberg unterscheidet dieselben von der auf echte Zellulose wirkenden Zellulase, die in holzerstörenden Pilzen vorkommt.

⁶⁾ Analog verhält sich die Zytase aus *Aspergillus Wentii*; Wehmer, Zentralbl. f. Bakt. [2] 2 (1896) 140.

⁷⁾ Brown u. Morris, Journ. Chem. Soc. 57 (1890) 497.

⁸⁾ Erst bei 70° geht auch die diastatische Wirkung verloren.

⁹⁾ Erwähnt sei hier auch die Auffassung von Roaf, Biochem. Journ. 3 (1909) 462, welcher eine spezifische Einstellung der ursprünglich generell hydrolysierenden Fermente mit der zunehmenden Differenzierung von einfachsten zu immer komplizierteren Lebewesen annimmt.

¹⁰⁾ Effront, Compt. rend. 125 (1897) 116.

die als Reservestoffe fungierenden Hemizellulosen auflösende Enzyme¹⁾ (Hemizellulasen), denen die nach Größ²⁾ im Herbst aus Zucker Hemizellulosen zurückbildenden Gegenenzyme (Cytokoagulase) gegenüberstehen. Bourquelot und Hérissé³⁾ wiesen die Seminase nach als Begleiter der Diastase im Malz und käuflichen Diastasepräparaten, sowie unter anderem in Medikago- und Trigonellaarten. Man wird dasselbe wohl überall dort im Pflanzenreiche finden, wo sich Mannogalaktan, sog. „Horneiweiß“⁴⁾ (Mannane und Galaktane) — aus Mannose und Galaktose aufgebautes Kohlehydrat — findet, welches durch Seminase aufgespalten wird. Auch den Xylose enthaltenden Xylanen soll ein diese aufspaltendes Enzym, die Xylanase, entsprechen⁵⁾. Wo es sich um eine Zerstörung verholzter Membranen handelt, wie sie unter anderem durch den Hausschwamm *Merulius lacrimans*⁶⁾ bewirkt wird, geht nach Czapek⁷⁾ dem Angriff der Zellulose eine durch ein besonderes Ferment, die Hadromase, verursachte Aufspaltung des im Holz vorliegenden Aethers zwischen Zellulose und Hadromal voraus.

Mit echten zellulosespaltenden Pilzenzymen haben sich de Bary⁸⁾ (*Peziza*), Manabu Miyoshi⁹⁾ (*Penicillium glaucum*), Marshall Ward¹⁰⁾ (*Botrytis*), Kean¹¹⁾ (*Rhizopus nigricans*) und Größ¹²⁾ (*Ustilago*) befaßt.

Auch in Bakterien kommen echte Zellulasen vor¹³⁾. Pringsheim hat

¹⁾ Mitscherlich, Berliner akad. Ber., math.-naturw. Kl. (1850) 102; Sachs, Bot. Zeitschr. (1862) 243; Reiß, Landwirtsch. Jahrbücher 18 (1889) 711; Green, Ann. Bot. 7 (1893) 93; Beyerinck, Zentralbl. f. Bakt. [2] 1 (1895) 239; Green-Windisch, Enzyme, 1901.

²⁾ Größ, Jahrb. f. wissensch. Botanik 47 (1910) 393; Biochemie u. Kapitalanalyse der Enzyme, 1912, S. 125.

³⁾ Bourquelot u. Hérissé, Compt. rend. Soc. Biol. 55 (1903) 699.

⁴⁾ Goret, Étude de quelques albumens cornés, Thèse Paris 1901; Champenois, Études des hydrates de carbone de réserve, Thèse Paris 1902.

⁵⁾ Seillière, Soc. Biol. 58 (1905) 409, 940, 63 (1907) 616, 66 (1909) 691.

⁶⁾ Siehe ferner Hartig, Die Zersetzungserscheinungen des Holzes, Berlin 1878; Der echte Hausschwamm, Berlin 1885; Wortmann, Biol. Zentralbl. 3 (1883) 265; Kohnstamm, Dissert., Erlangen 1900; Euler, Zeitschr. f. angew. Chem 25 (1912) 250.

⁷⁾ Czapek, Ber. d. bot. Ges. 27 (1899) 141; Biochemie der Pflanzen 1, 293.

⁸⁾ de Bary, Bot. Zeitschr. (1886) 415.

⁹⁾ Manabu Miyoshi, Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. 28 (1885) 227.

¹⁰⁾ Marshall Ward, Ann. Bot. 2 (1888), 12 (1898) 565.

¹¹⁾ Kean, Bot. Gazz. 15 (1890) 170.

¹²⁾ Größ, Ber. d. bot. Ges. 20 (1902) 214.

¹³⁾ Siehe de Bary, Vorlesungen über Bakterien, Leipzig 1866, S. 65; van Senus, Bijdrage tot de kennis der Cellulosegisting, Leyden 1890; Brown,

zum ersten Male die Gärungsfähigkeit der Zellulosegärer durch in Azeton gelöstes Jodoform sowie durch Temperaturvariation aufgehoben und gelangte so dazu, die Abbauprodukte der Zellulosespaltung, Zellobiose und Glukose, nachweisen zu können, welche auf das Konto der von den Bakterien abgesonderten Zellase kommen. Bei der analogen Verfolgung der Mannanspaltung erhielt Pringsheim¹⁾ zunächst ein Trisacharid (Trimannosid).

Zellase bei Kaltblütern fanden Bidermann u. Moritz²⁾ sowie Seillière³⁾. Doch kann es sich nach Seillières späteren Angaben⁴⁾ bei den gespaltenen Kohlenhydraten auch um leichter aufspaltbare Hemizellulosen (Pentosen) gehandelt haben, und die aufspaltenden Enzyme wären dann nicht echte Zellulasen, sondern Hemizellulasen⁵⁾. Bei Fischen sollen dagegen nach E. Müller⁶⁾ und Gatin⁷⁾, entgegen der Angabe von Knauth⁸⁾, sowohl Zellulasen wie Hemizellulasen fehlen.

Inulinase. Ein Ferment vom Charakter eines Endoenzyms, welches instande ist, das Inulin, das die Stärke vertretende Kohlenhydrat der Georginen, Artischocken, Zichorien und einer Anzahl anderer Pflanzen, auch Kryptogamen, wie Schimmelpilze und Hefen (Lindner, loc. cit.), in Fruktose zu spalten, ist dann ferner die Inulinase. Dieselbe wurde zuerst von Dragendorff⁹⁾ vermutet, dann von Green¹⁰⁾ und Bourquelot¹¹⁾ in *Helianthus tuberosus* und in Pilzen¹²⁾ auf-

Journ. Chem. Soc. London **61** (1892) 352; Scheunert, Zeitschr. f. physiol. Chem. **48** (1906) 9; Vorgänge im Dickdarm, Oppenheimers Handb. d. Biochem., Jena 1909 (Darmbakterien), und vor allen Pringsheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. **78** (1912) 266.

¹⁾ Pringsheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. **80** (1912) 376.

²⁾ Bidermann u. Moritz, Archiv f. d. ges. Physiol. **73** (1898) 291.

³⁾ Seillière, Compt. rend. Soc. Biol. **61** (1906) 205, **63** (1907) 515, **68** (1910) 107.

⁴⁾ Seillière, Compt. rend. Soc. Biol. **68** (1910) 989.

⁵⁾ Siehe über Hemizellulasen bei Schnecken: Bierry u. Giaja, Compt. rend. Soc. Biol. **60** (1906) 945; Compt. rend. **148** (1910) 507; Biochem. Zeitschr. **40** (1912) 370.

⁶⁾ E. Müller, Archiv f. d. ges. Physiol. **83** (1901) 619.

⁷⁾ Gatin, Compt. rend. Soc. Biol. **58** (1905) 847.

⁸⁾ Knauth, Zeitschr. f. Fischerei **5** (1897) 189.

⁹⁾ Dragendorff, Materialien zu einer Monographie des Inulins, St. Petersburg 1870.

¹⁰⁾ Green, Ann. of Bot. **1**, 223.

¹¹⁾ Bourquelot, Bull. Soc. Mycol. **9** (1893) 230, **10** (1894) 235; Compt. rend. **116** (1893) 1143.

¹²⁾ Dean, Bot. Gaz. **35** (1903) S. A., beobachtete die Bildung von Inulinase bei Kulturen von *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* auf inulinhaltigen Nährböden

gefunden. Auch in tierischen Organen (Milz und Plazenta)¹⁾, bei Schnecken im Hopatopankreas²⁾ wurde sie aufgefunden, und v. Tschermak³⁾ stellte fest, daß die nur spurenweise im Darm von Kaninchen vorhandene Inulinase eine starke Vermehrung durch Inulinfütterung erfährt. Das Enzym wird schon durch 0,01-normale Schwefelsäure⁴⁾ und 0,0001-normales Alkali geschädigt; auch wird die Wirkung gehemmt durch eine durch Immunisieren von Kaninchen erhaltene Anti-inulinase⁵⁾.

Endlich sei noch die von Bourquelot⁶⁾ aufgefundene Pektinase⁷⁾ erwähnt, deren Aufgabe es ist, die kohlenhydratähnlichen Pektinstoffe im unkoagulierten wie in dem durch die Pektase⁸⁾ bewirkten koagulierten Zustand zu verzuckern; sowie die Gelase⁹⁾, das wirk-same Ferment des *Bac. gelaticus*, welche den Hauptbestandteil des Agar-Agar, die Gelose, aufzuspalten vermag.

Der quantitative Nachweis irgendeines der genannten, auf Kohlenhydrate eingestellten Enzyme erfolgt in jedem einzelnen Fall¹⁰⁾ durch die Feststellung, ob das entsprechende Substrat eine Aufspaltung erfährt, die sich durch das Auftreten von reduzierendem Zucker verrät, und eventuell durch Feststellung, um welchen Zucker es sich handelt. So würde bei der Inulinase der Fruktosenachweis durch eine der besonderen Reaktionen auf diesen Zucker¹¹⁾ und durch die Linksdrehung bei der Polarisation zu führen sein.

¹⁾ Tanaka, Biochem. Zeitschr. 37 (1911) 249.

²⁾ Bierry, Compt. rend. 150 (1910) 116; Biochem. Zeitschr. 44 (1912) 402.

³⁾ v. Tschermak, Ebenda 45 (1912) 452.

⁴⁾ 0,0001-normale H_2SO_4 ist die für die fermentative Wirkung optimale Säurekonzentration; Dean, loc. cit. Fußnote 12, vorige Seite.

⁵⁾ Saiki, Journ. Biol. Chem. 3 (1907) 395.

⁶⁾ Bourquelot, Journ. Pharm. Chim. [6] 9 (1899) 563; Bourquelot u. Hérissey, Compt. rend. Soc. Biol. 50 (1898) 777; Journ. Pharm. Chim. [6] 9 (1899) 281, 10 (1899) 5, 11 (1900) 104; Compt. rend. 129 (1899) 228, 391, 130 (1900) 42, 340, 731.

⁷⁾ Der Pektinase analog ist die von Beyerinck u. van Delden, K. Akad. van Wetensch. Amsterdam 12 (1904) 2, 673, beschriebene Pektorinase, welche die Pektose des Flachses hydrolysiert; vgl. auch Behrens, Pektingärungen in La-far, Techn. Mykol. 3 (Jena 1906) 308, Kap. 10.

⁸⁾ Fremy, Journ. Pharm. Chim. 26 (1840) 368; Bertrand, Compt. rend. 119 (1894) 1012, 120 (1895) 110, 121 (1895) 726; Goyand, Ebenda 135 (1902) 537; Sorauer, Landwirtsch. Jahrbücher 42 (1912) 719.

⁹⁾ Gran, Bergens Museum Aalborg (1902) Nr. 2; Biochem. Zentralbl. 1 (1903) Nr. 399.

¹⁰⁾ Bei der Pektinase muß wegen der großen Säureempfindlichkeit Kreide zugesetzt werden.

Die quantitative Bestimmung, für welche praktisch noch wenig getan worden ist, kann nach Verfahren ähnlich dem bei der Diastase eingehend beschriebenen erfolgen. Insbesondere für eine Pathologie der Pflanzen können derartige Feststellungen von Bedeutung werden. Dies zeigt z. B. der von Jones¹⁾ geführte Nachweis, daß der *Bacillus Carotovorus*, der Erreger der Weichfäule der Mohrrüben, als wirksames Prinzip die Pektinase enthält. Ist aber in einem bestimmten Fall das die Schädigungen verursachende Enzym, das Toxin vom phytopathologischen Standpunkt aus, erkannt, so kann damit ein nicht unwichtiger Schritt zur Bekämpfung der betreffenden Krankheit getan sein.

An den Biologen tritt jedoch nicht nur die Frage heran, ein bestimmtes Ferment bzw. seine Wirkung in irgend welchen Materialien tierischer oder pflanzlicher Herkunft zu ermitteln, sondern es stellt sich hier vor allem auch das Problem des inneren Zusammenhangs verschiedenartiger Fermentwirkungen, das gerade im Gebiet der fermentativen Hydrolysen, namentlich wo es sich um verwandte Substrate handelt, durch theoretische Gesichtspunkte, wie sie in der Einleitung dargelegt wurden und durch verschiedene Angaben in der Literatur nahegelegt wird. So hat z. B. Tammann²⁾ angenommen, daß die Diastase auch imstande sei, Rohrzucker zu invertieren, und damit die Existenzberechtigung eines besonderen Rohrzucker invertierenden Enzyms in Frage gestellt. Größ³⁾ ist nun mittels seiner ingenösen kapillaranalytischen Methode unter anderem auch an dieses Problem herangetreten, das ihn, im Gegensatz zu seinem schon erörterten Nachweis der Zusammengehörigkeit von Diastase und Peroxydase zu der Auffassung geführt hat, daß Invertase und Diastase zwei verschiedene Enzyme sind, da die Randlinie des Kapillarisationsfeldes⁴⁾ lösliche Stärke im Verlauf von 1—2 Wochen deutlich ver-

¹⁾ Siehe darüber den Spez. Teil, 1. Abteilung im Kapitel: Katalyse durch Wasserstoffionen.

²⁾ Jones, Zentralbl. f. Bakt. [2] 14 (1905) 257.

³⁾ Tammann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 16 (1892).

⁴⁾ Größ, Biologie und Kapillaranalyse der Enzyme, Berlin 1912, S. 69, 70.

⁴⁾ Das Kapillarisationsfeld wird folgendermaßen erhalten: Ueber einen Messingreifen von 25 cm Durchmesser wird reines schwedisches Filtrierpapier mittels eines zweiten, den ersten umschließenden Messingreifens gespannt, ein Wasserring auf dem Papier hergestellt und einige Tropfen des fermenthaltigen Untersuchungsmaterials in seine Mitte gebracht. Man läßt nun so lange im dampfgesättigten Raum unter Wasserstoff kapillarisieren, bis keine weitere Ausbreitung erfolgt (ca. 6 Stunden) und zerschneidet das kreisförmige Feld in vier Quadranten

zuckerte — also diastasehaltig war, während ihr die Fähigkeit abging, im Verlauf von 4 Wochen Rohrzucker zu invertieren.

Die Prüfung auf Invertase erfolgt allgemein an einem Sektor des Kapillarisationfeldes oder — wie in dem vorliegenden Fall — an einzelnen, verschieden weit von der Mitte entfernten, herausgeschnittenen Zonen eines Sektors dadurch, daß man dieselben getrennt voneinander auf gleich große, mit Rohrzuckerlösung angefeuchtete Filtrierpapierstreifen legt, nach einer Einwirkungsdauer von 72 Stunden (unter allen Kautelen der Asepsis) die Zonen trocknet und zugleich mit den entsprechenden Kontrollzonen, die aus einem zweiten Sektor angefertigt, aber nicht mit Rohrzucker in Berührung waren¹⁾, in siedende Fehlingsche Lösung bringt. Die geschätzte Menge des ausgeschiedenen Kupferoxyduls, vermindert um die geschätzte Menge des Kupferoxyduls des Kontrollstreifens, ergibt dann ein ungefähres Maß für den Invertasegehalt der betreffenden Zone des Kapillarisationfeldes²⁾.

Die Prüfung auf Diastase erfolgt in der Weise, daß der betreffende Ausschnitt mit einer Lösung von löslicher Stärke angefeuchtet wird — oder besser durch Auflegen auf Stärkepapier — worauf die Jodreaktion nach 24 Stunden ausgeführt wird³⁾.

Nicht minder wertvoll ist der Beitrag, welchen Größ⁴⁾ zur oder allgemein in so viele Sektoren, als Untersuchungen vorgenommen werden sollen.

¹⁾ Um eine Täuschung durch vorgebildeten reduzierenden Zucker auszuschließen.

²⁾ Zur kapillaranalytischen Prüfung auf das z. B. von Pantanelli, Ber. d. bot. Ges. (1908) Heft 7, für Pilze beschriebene Gegenenzym der Invertase, die Revertase, könnte man umgekehrt auf das Verschwinden bzw. die Verminderung der Reduktionswirkung auf mit Invertzucker getränkten Papierstreifen abstellen, wenn dieselben der Einwirkung Revertase führender Sektoren ausgesetzt werden. Untauglich ist die Methode aber natürlich für den Nachweis fermentativer Synthesen, die zu einem selbst reduzierenden Kohlehydrat, wie z. B. Maltose resp. Isomaltose, aus Glukose führen [vgl. über das Gleichgewicht zwischen Maltose und Dextrose Pomeranz, Monatsh. f. Chem. 23 (1902) 750].

³⁾ In anderen Fällen kann man auch, ebenfalls mit Fehlingscher Lösung, wie oben angegeben, an Hand des Verzuckerungsvermögens auf Diastase prüfen. Beide Proben können kombiniert und zu Untersuchungen, die die Zweienzymtheorie der Diastase betreffen, verwertet werden; doch darf man dabei nicht übersehen, daß Ungleichheiten, die sich nach den beiden Verfahren am selben Kapillarisationfeld geltend machen, nicht notwendig im Sinne der Zweienzymtheorie gedeutet zu werden brauchen, da die Begleitstoffe der Diastase auf die beiden Reaktionen ungleich fördernd oder hemmend wirken könnten.

⁴⁾ Größ, loc. cit. vorige Seite, Fußnote 3, S. 104—106.

Amylokoagulasefrage geliefert hat. Auch hier bedient er sich zur Trennung der Diastase von der Amylokoagulase des Kapillarisationfeldes, hergestellt z. B. aus dem Saft von 30 Embryonen 2 Tage gekelter Gerste, die mittels Glas unter Zusatz von 6 Tropfen Glyzerin fein zerrieben wurden. Das Feld wurde in 3 ringförmige Streifen zerlegt, die fein zerfasert und mit je 8 ccm Wasser ausgeschüttelt wurden, wovon je 4 ccm nach dem Aufkochen als Kontrolle dienten. Dann wurde jede Probe mit 25 ccm einer 2%igen Stärkelösung¹⁾ unter Zusatz von Thymol als Antiseptikum 48 Stunden in Berührung gelassen, wonach sich in der Lösung, die den Auszug des Mittelstreifens enthielt, starke Koagulation ergab, während die Lösung des Randstreifens nur eine schwach koagulierende und die Lösung des innersten Streifens gar keine Koagulation zeigte, da in diesem letzteren Fall nur die Wirkung der Diastase zur Geltung gekommen war und Verzuckerung bewirkt hatte.

Es muß hier dahingestellt bleiben, ob der Diastasegehalt größer oder die Bedingungen für die Diastasewirkung im innersten Streifen günstigere waren, sei es infolge der Anreicherung von Diastaseaktivatoren oder infolge der Abnahme von Hemmungsstoffen. Für die vorherrschende Amylokoagulasewirkung im Mittelstreifen gilt das gleiche. In erster Linie sind es die Variationen der Reaktion des Mediums, die in Frage kommen, da nach Angaben von Fernbach in einem Vortrag²⁾ die Bedingungen für die Verzuckerung einer Stärkelösung dann bestehen, wenn man sie gegen Methylorange neutralisiert, während für die Koagulation die Neutralität gegen Phenolphthalein die günstigste Reaktion des Mediums darstellt³⁾. Es ist wohl kein zufälliges Zusammentreffen, daß die diesen Neutralitätsmaßen entsprechenden H⁺- und OH⁻-Ionenkonzentrationen dieselben sind, die nach Holderer⁴⁾ die Filtrationsfähigkeit der Enzyme von *Aspergillus* und Malz beherrschen, indem sie eine Aenderung der Teilchengröße bedingen. Dementsprechend vermögen die Enzyme in einer gegen Phenolphthalein neutralen Lösung Porzellanfilter zu passieren, während sie in einer gegen Methylorange neutralen Lösung vom Filter zurückgehalten werden⁵⁾. Gerade für die Untersuchung im Kapillarisationfeld dürften insbesondere die elektrolytischen Begleitstoffe der Diastase in den natürlichen Säften weit mehr, als dies bis jetzt geschieht, in Rechnung gezogen werden. Ein festgestelltes Fehlen von Diastase-

¹⁾ Hergestellt durch 1½stündiges Erhitzen auf 110°.

²⁾ Zitiert nach Grüß, loc. cit. S. 102.

³⁾ Siehe demgegenüber die frühere Angabe (S. 93) über Ausfällung von Stärke in Form von Sphärökrystallen und von Glykogen durch Säuren. Siehe auch Grüß, loc. cit., über nichtenzymatische koagulierende Substanzen des Zellsafts.

⁴⁾ Holderer, Compt. rend. 150 (1910) 790.

⁵⁾ Ueber die Beeinflussung der Teilchengröße und Zahl durch Elektrolyte, welche fällend und fällungshemmend auf Kolloide wirken (gemessen an der Aenderung des osmotischen Drucks), siehe Lillie, Amer. Journ. Physiol. 20 (1907) 127.

wirkungen in irgend einer Zone des Kapillarisationfeldes braucht durchaus nicht durch einen absoluten Mangel an Diastase bedingt zu sein. Es kann auch daher rühren, daß durch die Filterfaser eine Trennung von Elektrolyten und Diastase in der betreffenden Zone bewerkstelligt worden ist, wodurch die Diastase wie bei der Trennung von den Elektrolyten durch Dialyse eine vollständige Inaktivierung erfährt¹⁾. In diesem Umstand — wie in dem entgegengesetzten einer übermäßigen Konzentration der Elektrolyte in anderen Teilen des Kapillarisationfeldes mit der hierdurch bedingten Beeinflussung der Diastasewirkung — dürfte eine wesentliche Störungsquelle der schönen kapillaranalytischen Untersuchungsmethoden stecken. Andererseits können auch unter natürlichen Bedingungen Trennung und ungleiche Verteilung von Fermenten und Elektrolyten durch Kapillarität in Gewebeelementen vorkommen und physiologisch von großer Bedeutung im Getriebe der wechselnden Aktivierungen und Hemmungen fermentativer Prozesse des Organismus sein. Nach den Untersuchungen von Quinau²⁾ wechselt im übrigen das Verhalten der Diastase gegenüber Elektrolyten mit ihrer Herkunft bzw. der Zusammensetzung des Mediums, in welchem sie im gewöhnlichen zur Wirkung gelangt und an das sie sich daher am weitgehendsten angepaßt hat. Nicht unmöglich ist es, daß eine ganze Reihe von Anpassungserscheinungen von Enzymen an besondere Substrate auch mit diesen Vorgängen im Zusammenhang stehen. Jedoch ist die ganze Frage der Anpassung noch keineswegs geklärt. Interessant wäre z. B. ein Vergleich der Angreifbarkeit der in den verschiedenen Weltteilen als Hauptnahrungsmittel dienenden Stärkeart durch die Speichel- und Pankreasdiastase der betreffenden Völker. Die relativ schwere Angreifbarkeit der Arrowrootstärke durch Speichel, welche H. Maggi und der Verfasserin aufgefallen ist, würde möglicherweise bei der Prüfung eines Eingeborenenspeichels in Südamerika gegenüber derselben Stärkeart das gegenteilige Ergebnis liefern. Allerdings spricht dagegen, daß H. Maggi³⁾ bei der vergleichenden Untersuchung über die Einwirkung von Formaldehyd und Speicheldiastase auf eine Reihe Stärkesorten des Handels feststellte, daß die Arrowrootstärke hier wie dort in gleichen Zeiten eine geringere Verflüssigung ergab als die Mehrzahl der anderen geprüften Stärkesorten. Derselbe Parallelismus ergab sich auch bei der Kartoffelstärke im Einklang mit dem Befund von Hammarsten⁴⁾ über deren schwere Angreifbarkeit durch Speicheldiastase und beim Weizenstärkekorn, das relativ leicht von Speicheldiastase wie von Formaldehyd gelöst wird und — in Uebereinstimmung mit den Befunden von Lang⁵⁾ bei Pankreasamylase — auch ein größeres Vermögen zur Auflösung als Reisstärke zeigt. Auch der mikrochemisch mit Fehlingscher Lösung ausgeführte Reduktionsversuch an mit Formaldehyd mehrere Wochen in der Höhlung eines Objektträgers gestandener Weizenstärke ergab ein ausgesprochen positives Resultat. Es steht dies im Einklang mit dem

¹⁾ Siehe Bierry, Giaja u. Henry, *Compt. rend. Soc. Biol.* 60 (1906) 479; Bierry, *Biochem. Zeitschr.* 40 (1912) 357; Starkenstein, *Ebenda* 24 (1910) 210.

²⁾ Quinau, *Journ. Biol. Chem.* 6 (1909) 53.

³⁾ H. Maggi, *Fermentforschung* 2 (1919) 306, Tafel III.

⁴⁾ Hammarsten, *Upsala Läk. Förh.* 6, 471; Virchow-Hirsch, *Jahrb.* (1871) 95.

⁵⁾ Lang, *Zeitschr. f. experim. Pathol.* 8 (1910) 279.

Befund von Solera¹⁾ bei der Speicheldiastase, daß gerade Weizenstärke im Gegensatz zu der Kartoffelstärke die größte Zuckermenge ergibt²⁾. Dieses ungleiche, mit der Temperatur nach Lintner³⁾ sich verschiebende Verhalten von Stärkekörnern verschiedener Herkunft gegenüber lösenden Prinzipien dürfte seine Ursache in der chemischen Inhomogenität — vielleicht auch in physikalischen Differenzen — der das Stärkekorn zusammensetzenden Substanzen besitzen: der im Innern befindlichen phosphorfreien „Amylose“ und dem aus einem Amylose-phosphorsäureester aller Wahrscheinlichkeit nach bestehenden „Amylopektin“ der Hüllsubstanz⁴⁾.

Um auch bei Gegenwart wirksamer Diastase die Amylokoagulase nachzuweisen, empfiehlt Größ⁵⁾, der Stärkelösung 50% Maltose hinzuzufügen, welche die verzuckernde Wirkung der Diastase völlig zu hemmen vermag⁶⁾, entsprechend den Forderungen des Massenwirkungsgesetzes.

Glykosidasen.

Diese Enzyme sind, wie der Name besagt, auf Glykoside und zwar auf die natürlich vorkommenden, dem β -Typus angehörenden Glykoside eingestellt und werden wohl überall, wo sich diese im Pflanzenreich und bei den Wirbellosen⁷⁾ (oder deren Umgebung) finden, vorhanden sein.

¹⁾ Solera, *Malys Jahrb.* (1875) 235.

²⁾ Vgl. ferner Sheridean Lea, *Journ. Physiol.* **11** (1890) 234; Nagao, *Zeitschr. f. experim. Pathol.* **9** (1911) 227, sowie auch Wolff, *Compt. rend.* **144** (1907) 1368; Fernbach u. Wolff, *Ebenda* **145** (1907) 80.

³⁾ Lintner, *Journ. f. prakt. Chem. [N. F.]* **34** (1886) 378, **36** (1887) 481; vgl. auch Brasse, *Compt. rend.* **100** (1885) 454.

⁴⁾ Siehe Maquenne u. Roux, *Bull. Soc. Chim.* **33** (1905) 723; *Ann. Chim. Phys.* [8] **9** (1906) 179; Gruzewska, *Journ. Physiol. et Pathol. gén.* **14** (1912) 7, 32; Gruzewska u. Bierry, *Compt. rend.* **149** (1909) 359; Samec, *loc. cit.*

⁵⁾ Größ, *loc. cit.* S. 119.

⁶⁾ Siehe jedoch die auf S. 138 besprochenen anderen Deutungsweisen der Beobachtungen, die zur Annahme einer besonderen Amylokoagulase geführt haben.

⁷⁾ Bourquelot, *Digestion chez les mollusques*, Thèse Paris 1885; Fischer, *Therap. Monatsh.* (1902) Dezemberheft; Kobert, *Archiv f. d. ges. Physiol.* **99** (1903) 116; Bierry u. Giaja, *Compt. rend. Soc. Biol.* **61** (1906) 485, 486; Giaja u. Gompel, *Ebenda* **62** (1907) 1197. Die höheren Tiere sollen über keine eigentlichen Glykosidasen verfügen, obgleich die Tatsache festgestellt ist, daß zum mindesten bei Pflanzenfressern Leber und Niere imstande sind, Glykoside zu zerlegen [siehe Charlier, *Compt. rend. Soc. Biol.* **53** (1901) 494; Gérard, *Ebenda* **53** (1901) 99; Gonnermann, *Pflügers Archiv* **113** (1906) 168; Kusumoto, *Biochemische Zeitschr.* **10** (1908) 264; Omi, *Ebenda* **10** (1908) 258; Baß, *Zeitschr. f. experim. Pathol.* **10** (1911) 120]. Spaltung von verschiedenen Glykosiden durch andere Organe wurde angegeben von Heß, *Wiener klin. Wochenschr.* **24** (1911) 1009; Thomas u. Frouin, *Ann. Inst. Pasteur* **23** (1909) 261; Higuchi, *Bio-*

Mit der Natur der Glykoside — jener Halbkohlenhydrate, die in ihrem Molekül die verschiedensten Stoffe an Traubenzucker gebunden enthalten, wechselt der Charakter der spaltenden Glykosidase nur in einem Teil der Fälle.

Das Emulsin.

Die Glykosidase, der bei weitem die größte Bedeutung zukommt, das Emulsin, oder gemäß den Ergebnissen der jüngsten Forschung deren wesentlicher Bestandteil (der die typische Glykosidbindung zwischen dem aromatischen Rest und der Glukose zu lösen vermag), die β -Glykosidase, welche Armstrong¹⁾ als Prunase²⁾ bezeichnet, hat vielmehr die Natur eines generellen Katalysators³⁾.

Außerdem ist im Emulsin ein α -Ferment, die vielleicht mit der Melibiase identische Amygdalase⁴⁾ enthalten, welche das mit dem d-Benzaldehydzyanhydrin verbundene, der Maltose verwandte, aber nicht mit ihr identische, als Amygdalose bezeichnete Disaccharid des Amygdalins⁵⁾ zu spalten und damit erst das restierende l-Mandelnitrilglykosid, Prunasin (Armstrong), der Wirkung der Prunase zugänglich zu machen vermag. Das neben β -Glukose entstehende Produkt der Prunasespaltung, das Benzaldehydzyanhydrin, würde dann endlich durch ein drittes

chemische Zeitschr. 17 (1909) 21; Mihara, Zeitschr. f. physiol. Chem. 75 (1911) 443; Auld, Journ. Board Agricult. 19 (1912) 446; Zentralbl. f. Biochem. 14 65. Wenn sich die Annahme, daß die Tiere keine Glykosidasen besitzen, nicht als unzutreffend erweist, — von anderer Seite wird nämlich das Vorhandensein von Glykosidasen bei höheren Tieren behauptet [siehe Staedeler, Journ. f. prakt. Chem. 72 (1857) 250; Fubini, Archiv ital. d. Biol. 14 (1891) 456; Gérard, Journ. Pharm. Chim. [6] 3 (1896) 233; Compt. rend. Soc. Biol. 48 (1896) 44; siehe jedoch Grisson, Dissert., Rostock 1887] — so müßte man ein anderes spaltendes Prinzip in diesem Fall annehmen, vielleicht einfach Wasserstoffionen, die von dem zu spaltenden Substrat aus den Körpersäften an sich gerissen werden und damit eine intermediäre, der Spaltung vorausgehende Bindung eingehen (siehe Allg. Teil). Bei der problematischen Natur der Fermente kann man jedoch die Frage stellen, ob nicht jedes im Organismus vorhandene glykosidspaltende Prinzip, welches auch seine Natur sei, auf den Namen Glykosidase Anspruch erheben kann.

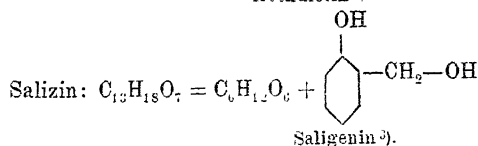
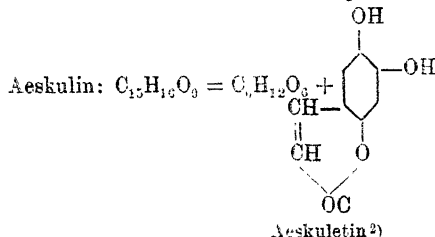
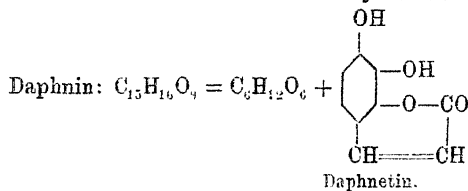
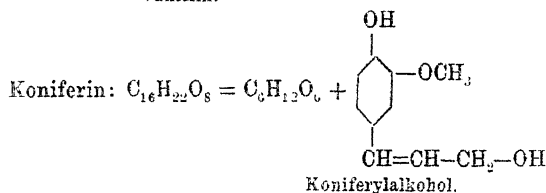
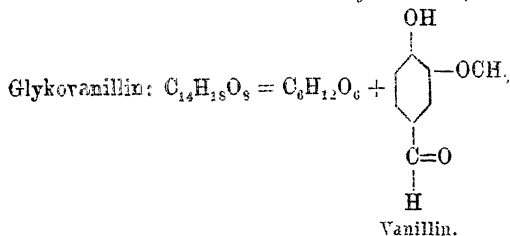
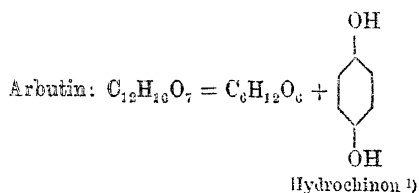
¹⁾ Armstrong u. Horton, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 85 (1912) 359.

²⁾ Synonym damit ist die von Bertrand u. Compton, Compt. rend. 152 (1911) 1518; Ann. Inst. Pasteur 26 (1912) 161, vorgeschlagene Bezeichnung Amygdalinase.

³⁾ Gewisse Modifikationen im Aufbau sollen übrigens auch das Emulsin verschiedener Herkunft auszeichnen; wenigstens macht Hérissay, Recherche sur l'Emulsine, Thèse, Paris 1899, S. 6, Angaben, welche hierauf hindeuten.

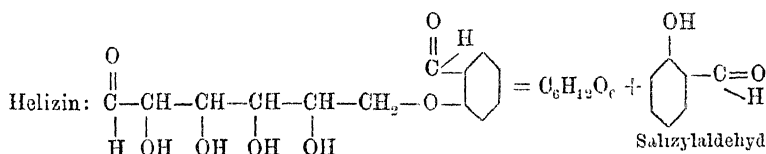
⁴⁾ Siehe Neubergs Nachweis der Aufspaltung der Raffinose durch Emulsin [Biochem. Zeitschr. 3 (1907) 519].

⁵⁾ Siehe Caldwell u. Courtauld, Journ. Chem. Soc. London 91 (1907) 666; Rosenthaler, Archiv d. Pharm. 245 (1908) 684, 246 (1908) 365.



¹⁾ Kawalier, Journ. f. prakt. Chem. 58 (1858) 193; Bourquelot u. Hérissey, Journ. Pharm. Chim. 27 (1908) 421; Compt. rend. 146 (1908) 764; Bourquelot u. Fichtenholz, Ebenda 151 (1910) 81; Journ. Pharm. Chim. [7] 2 (1910) 97, 4 (1911) 145, 441, 5 (1912) 425; Fichtenholz, Ebenda 30 (1909) 199, [7] 2 (1910) 193; Compt. rend. Soc. Biol. 66 (1909) 830.

²⁾ Sigmund, Monatsh. f. Chem. 30 (1910) 77, 31 (1910) 657, hat ein be-



sowie ferner das Isoamygdalin¹⁾, das Mandelnitrilglykosid²⁾ (siehe S. 141), das Sambunigrin^{3a)} (optisches Isomere des Amygdonitrilglykosids), das Prulaurasin⁴⁾ (letzterem zugehöriger Razemkörper), das Pizein⁵⁾, das Verbenalin⁶⁾, das Taxikatin⁷⁾, das Syringin⁸⁾, das Erytamin⁹⁾, das Vizianin¹⁰⁾, das Aukubin¹¹⁾, das Dhurrin¹²⁾, das Oleuropin¹³⁾, das Bakankosin¹⁴⁾, das Salinigrin¹⁵⁾, das Serotrin¹⁶⁾,

sonderes, von der Prunase verschiedenes spaltendes Prinzip im Emulsin hier wie beim Arbutin angenommen.

³⁾ Piria, Ann. Chim. Phys. [3] **14** (1845) 257; Krauch, Landwirtsch. Versuchsstat. **23** (1877) 77.

¹⁾ Dakin, Journ. Chem. Soc. **85** (1904) 1512.

²⁾ Emil Fischer, Ber. d. chem. Ges. **28** (1895) 1508; Bourquelot u. Hérissé, Journ. Pharm. Chim. **7** (1907) 1; Archiv d. Pharm. **245** (1907) 474; Caldwell u. Courtauld, Journ. Chem. Soc. **91** (1907) 666.

^{3a)} Dakin, loc. cit. vorletzte Fußnote; Guignard, Compt. rend. **141** (1905) 16; Bourquelot u. Danjou, Compt. rend. Soc. Biol. **59** (1905) 18, 292, 60 (1906) 83, 63 (1907) 405; Bourquelot u. Hérissé, Ebenda **62** (1907) 828; Danjou, Thèse 1906.

⁴⁾ Bourquelot u. Hérissé, loc. cit. vorletzte Fußnote; Hérissé, Journ. Pharm. Chim. [6] **23** (1906), [6] **26** (1907) 1. Sept.; Archiv d. Pharm. **245** (1907) 463, 473, 638; Soc. Biol. **61** (1906) 399.

⁵⁾ Tanret, Compt. rend. **119** (1894) 80.

⁶⁾ Bourdier, Soc. Biol. **63** (1907) 367; Thèse Paris 1908.

⁷⁾ Lefebvre, Journ. Pharm. Chim. **26** (1907) 241; Archiv d. Pharm. **245** (1907) 486.

⁸⁾ Vintilesco, Journ. Pharm. Chim. **24** (1906) 145, 529; Thèse Paris 1910.

⁹⁾ Hérissé u. Bourdier, Journ. Pharm. Chim. **28** (1908) 252.

¹⁰⁾ Bertrand, Compt. rend. **143** (1906) 832; Bertrand u. Rivkind, Ebenda **143** (1906) 970; Bull. Soc. Chim. **37/38** (1907) 151; Dieselben, Ebenda **37/38** (1907) 497; Bertrand u. Weisweiler, Compt. rend. **147** (1908) 252.

¹¹⁾ Bourquelot u. Hérissé, Ann. Chim. Phys. [8] **4** (1905) 289; Bourdier, Thèse Paris 1908; Journ. Pharm. Chim. **26** (1907) 254; Hérissé u. Lebas, Ebenda [7] **2** (1910) 490.

¹²⁾ Dunstan u. Henry, Chem. News **85** (1902) 301; Phil. Transact. **199** (1902) 399; Proc. Royal Soc. London [Ser. B] **70** (1902) 153; Schröder u. Dammann, Chem.-Ztg. **35** (1911) 1436.

¹³⁾ Bourquelot u. Vintilesco, Compt. rend. **147** (1908) 583; Journ. Pharm. Chim. [6] **28** (1908) 1. Oktober, [7] **1** (1910) 292.

¹⁴⁾ Bourquelot u. Hérissé, Compt. rend. **147** (1908) 750; Journ. Pharm. [6] **25** (1908) 417.

das Inkarnatrin¹⁾, das Androsin²⁾, das Asebotin³⁾, das Meliatin⁴⁾, das Hepatrilobin⁵⁾, das Karakin und Korynokarpin⁶⁾, das Gentiopikrin⁷⁾, das Phyllirin, das Linamarin (Phaseolunatin⁸⁾, die Amygdalinsäure, Glykosalizylsäure⁹⁾, Glykovanillinsäure¹⁰⁾, Euxanthonsäure¹¹⁾, Syringaglykuronsäure¹²⁾, 1-Kamphoglykuronsäure¹³⁾, sowie das Amid des Glykosids der Glykolsäure¹⁴⁾ usw.^{15a)}. Bei einer Reihe anderer Glykoside, Phlorizin^{16a)}, Populin¹⁷⁾, Primiverin und Primulaverin¹⁸⁾,

¹⁵⁾ Jowett, Transact. Chem. Soc. (1900) 708.

¹⁶⁾ Power u. Moore, Ebenda 97 (1910) 1099.

¹⁾ Rogerson, Ebenda 97 (1910) 1004.

²⁾ Ch. W. Moore, Ebenda (1909) 734.

³⁾ Bourquelot u. Fichtenholz, Compt. rend. 153 (1911) 1500; Journ. Pharm. Chim. [7] 5 (1912) 49, 296.

⁴⁾ Bridel, Compt. rend. 152 (1911) 1694; Journ. Pharm. Chim. [7] 4 (1911) 49, 97, 161.

⁵⁾ Delattre, Journ. Pharm. Chim. [7] 6 (1912) 292.

⁶⁾ Easterfield u. Aston, Proc. Soc. Chem. London 19 (1903) 191.

⁷⁾ Bourquelot u. Bridel, Journ. Pharm. Chim. [7] 1 (1910) 109, 149; Bridel, Thèse Paris 1911.

⁸⁾ Jorissen u. Hairs, Bull. Acad. de Belgique [3] 21 (1891) 529; Dunstan u. Henry, Proc. Royal Soc. London 72 (1903) 285; Dunstan, Henry u. Auld, Ebenda 78 (1906) 145, 79 (1907) 315; Jorissen u. vorige, Bull. Acad. de Belgique [Cl. des Sc.] (1907) 12, 790, 793; Armstrong u. Horton, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 82 (1910) 349; Armstrong u. Eyre, Ebenda 85 (1912) 370; Armstrong, Ebenda 84 (1912) 471; vgl. auch van Rombusch, Ann. Jardin Buitenzorg 16 (1899) 1; Emil Fischer u. Gerda Anger, Ber. d. chem. Ges. 52 (1919) 854; siehe ferner Bourquelot, Journ. Pharm. Chim. [6] 30 (1909) 385.

⁹⁾ Schützenberger, Die Gärungserscheinungen, Internat. wissenschaft. Bibliothek, 1876, S. 271; Slimmer, Ber. d. chem. Ges. 35 (1902) 4260.

¹⁰⁾ Slimmer, Ber. d. chem. Ges. 35 (1902) 4160.

¹¹⁾ Neuberg u. Neimann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44 (1905) 114.

¹²⁾ Hildebrandt, Hofmeisters Beitr. 7 (1906) 438.

¹³⁾ Hämäläinen, Skand. Arch. Physiol. 23 (1910) 297.

¹⁴⁾ Emil Fischer u. Helferich, Ann. Chem. 383 (1912) 68.

^{15a)} Siehe ferner Piault, Journ. Pharm. Chim. 29 (1909) 236; Vintilesco, Ebenda [7] 1 (1910) 162; Khouri, Ebenda [7] 2 (1910) 211; Lesueur, Ebenda [7] 3 (1911) 399; Power u. Gornall, Transact. Chem. Soc. 85 (1904) 838; Power u. Barrowcliff, Ebenda 87 (1905) 884; Power u. Moore, Ebenda 99 (1911) 937; Power u. Callan, Ebenda 99 (1911) 1993; van Itallie, Archiv d. Pharm. 243 (1905) 553, 248 (1910) 251.

^{16a)} Charlier, Compt. rend. Soc. Biol. 53 (1901) 494; Bierry u. Giaja, Ebenda 62 (1907) 1117; Omi, Biochem. Zeitschr. 10 (1903) 258.

¹⁷⁾ Weevers, Rec. trav. botan. néerland. 7 (1910) 1; Zentralbl. f. Biochem. 11, 2075.

(Gein¹⁾, Kolanin²⁾, Tannin³⁾, Gaultherin⁴⁾, Gynokardin⁵⁾, Lotusin⁶⁾, Isatan⁷⁾, werden besondere Fermente für die Spaltung verantwortlich gemacht, deren Name im allgemeinen durch die Endung „ase“ an den Stamm des betreffenden Glykosids abgeleitet wird. Doch kann sich der Name wie bei der Elaterase⁸⁾ oder der Rhamnase (Rhaminase)⁹⁾, dem das Xanthorhamnin¹⁰⁾ spaltenden Ferment, auch nach einem Spaltprodukt (Rhamnose, Rhamnetin, Elaterin) richten, oder wie beim Indimulsin¹¹⁾, welches das Indikan der Indigo führenden Pflanzen spaltet oder beim Erythrozym¹²⁾, das auf die Ruberythrinsäure eingestellt ist, unabhängig vom Glykosid abgeleitet sein. Oder es wird endlich nur von dem Vorhandensein eines derartigen Enzyms Notiz genommen¹³⁾.

¹⁸⁾ Goris u. Maseré, *Compt. rend.* **149** (1909) 947 u. *Bull. Sc. Rouhe-Bertrand* [3] **6** (1912) 5; *Zentralbl. f. Biochem.* **14**, 924.

¹⁾ Bourquelot u. Hérissé, *Compt. rend. Soc. Biol.* **58** (1905) 524; *Journ. Pharm. Chim.*, 16 Mai 1905.

²⁾ Schweitzer, *Pharm. Zeitschr.* **43** (1898) 380.

³⁾ Pottévin, *Compt. rend.* **111** (1890) 1215; Fernbach, *Ebenda* **131** (1900) 1214.

⁴⁾ Procter, *Amer. Journ. Pharm.* **15**, 341; Schneegans u. Gerock, *Archiv d. Pharm.* **232** (1894) 437; Bourquelot, *Journ. Pharm. Chim.* [6] **3** (1896) 577; Beyerinck, *Zentralbl. f. Bakt.* [2] **5** (1899) 425.

⁵⁾ Power u. Lees, *Transact. Chem. Soc.* **87** (1905) 349; de Jong, *Rec. trav. chim. Pays-Bas* **28** (1909) 24, **30** (1911) 200; Moore u. Tutin, *Transact. Chem. Soc.* **97** (1910) 1285.

⁶⁾ Dunstan u. Henry, *Proc. Royal Soc. London* [Ser. B] **67** (1901) 224. **68** (1901) 374.

⁷⁾ Beyerinck, *K. Akad. van Wetensch. Amsterdam* (1900) 74; *Malys Jahrb.* **30**, 974.

⁸⁾ Berg, *Bull. Soc. Chim.* [4] **7** (1910) 385; *Compt. rend. Soc. Biol.* **71** (1911) 74; *Compt. rend.* **154** (1912) 370.

⁹⁾ Marshall Ward u. Dunlop, *Ann. Bot.* **1** (1887) 1; Tanret, *Bull. Soc. Chim.* [3] **21** (1899) 1065; ter Meulen, *Rec. trav. chim. Pays-Bas* **24** (1905) 444.

¹⁰⁾ Das Xanthorhamnin ist das einzige Glykosid, welches bei der Spaltung keine Glukose, sondern Rhamnose und Rhamnetin liefert.

¹¹⁾ v. Lookeren-Campagne, *Landwirtsch. Versuchsstat.* **43** (1894) 401; Bréaudat, *Compt. rend.* **127** (1898) 769; Beyerinck, *K. Akad. van Wetensch. Amsterdam* (1900) 572; *Malys Jahrb.* **30** (1900) 973; Hazewinkel, *Ebenda* **30** (1900) 976; *K. Akad. van Wetensch. Amsterdam* (1900) 590; siehe ferner Bergtheil, *Journ. Chem. Soc. London* (1904) 870; Gaunt, Thomas u. Bloxam, *Journ. Soc. Chem. Ind.* **26** (1907) 1174; Thomas, Bloxam u. Perkin, *Journ. Chem. Soc. London* **95** (1909) 824.

¹²⁾ Schunck, *Journ. f. prakt. Chem.* **63** (1854) 222.

¹³⁾ Z. B. beim Päonol abspaltenden Enzym der Päoniawurzeln [Péron,

Anwendung des Emulsins zur Identifizierung, Konstitutions- und Konfigurationsbestimmung von Glykosiden und Polysacchariden.

Für die Ermittlung der Zusammensetzung all der genannten Glykoside¹⁾ hat das Emulsin die größten Dienste geleistet. Bourquelot²⁾ betont die Notwendigkeit bei solchen Untersuchungen, zunächst den Rohrzucker durch Invertase zu eliminieren, welche aus mit Alkohol abgetöteter Bäckerhefe hergestellt wird, um Störungen durch die Amygdalase gewöhnlicher Unterhefe zu vermeiden.

Auch über die eigentlichen Glykoside hinaus im Gebiet der echten Kohlenhydrate ist das Emulsin analytisch zu verwerthen. So zeigte Neuberg³⁾, daß die Raffinose durch Emulsin (Prunase) in Rohrzucker und d-Galaktose zerlegt wird, eine Reaktion, die zur Erkennung kleinster Raffinosemengen geeignet ist. Für den praktisch wichtigsten Fall, den Raffinosenachweis in Rohrzucker, zeigten Neuberg und Marc⁴⁾, daß das Auftreten eines durch die Bildung der Galaktose bedingten Reduktionsvermögens nach Emulsinbehandlung der neutralisierten Probe für die Gegenwart von Raffinose charakteristisch ist, da Rohrzucker selbst durch Emulsin keine Aufspaltung erleidet. Es läßt sich auf diesem Wege noch ein Teil Raffinose in 100—250 Teilen Rohrzucker auffinden.

Da das Emulsin bzw. die Prunase (die für solche Untersuchungen aus dem Emulsin isoliert, oder — da hierzu noch die experimentelle Grundlage fehlt — in reinem Zustand, wie sie sich in den Blättern von Prunusarten findet⁵⁾, verwendet werden sollte)⁶⁾ nur auf β -Glyko-

Compt. rend. Soc. Biol. 69 (1910) 476; Jonck, Beiträge zur Kenntnis der Blausäure abspaltenden Glykoside, Straßburg 1902].

¹⁾ Siehe auch Bourquelot, Archiv d. Pharm. 245 (1907) 172; van Rijn. Die Glukoside, Berlin 1900.

²⁾ Bourquelot, Journ. Pharm. Chim. [6] 23 (1906) 15. April, [6] 24 (1906) 165, 25 (1907) 16, 387; Archiv d. Pharm. 245 (1907) 172.

³⁾ Neuberg, Biochem. Zeitschr. 3 (1907) 519.

⁴⁾ Neuberg u. Marc, Biochem. Zeitschr. 3 (1907) 535.

⁵⁾ Da eine Extraktion der Prunase aus den Blättern bisher nicht gangbar ist, so müssen an Stelle des Blätterextraktes bzw. der aus dem Extrakt, z. B. der Mandeln, wie beim Emulsin [vgl. Robiquet, loc. cit; Thomson u. Richardson, Ann. d. Pharm. 29 (1839) 180; Ortloff, Archiv d. Pharm. 48 (1846) 12; Kérissey, Thèse Paris (1899) 6] durch Fällung mit Alkohol usw. erhaltenen wirksamen Präparate, die Blattpulver, selbst verwendet werden.

⁶⁾ Nur durch Verwendung von Prunase allein können Komplikationen von Seiten des α -Ferments, welches die Prunase im Emulsin begleitet, vermieden werden.

side eingestellt ist, so ist damit ferner der Aufbau der Raffinose nach dem β -Typus erwiesen.

Das nämliche hat sich für Genziobiose durch die Emulsinspaltung dartun lassen.

Das Gegenstück zur Prunase bildet die Maltase, welche gerade umgekehrt nur Glykoside und Polysaccharide, welche der α -Form zugehören, zu zerlegen vermag¹⁾.

Für die Feststellung der Konfiguration²⁾ eines Zuckers oder eines Glykosides leistet also die Maltase so viel wie das Emulsin. Man hat z. B. nichts weiter nötig als die nur über Maltase verfügende Hefe *Schizosaccharomyces octosporus* oder einen Schimmelpilz der Gattung *Mucor* in der den betreffenden Zucker oder das Glykosid enthaltenden Lösung wachsen zu lassen und das Vorhandensein oder Fehlen der Spaltprodukte nach stattgefundener Einwirkung zu konstatieren, um zu wissen, ob ein Zucker oder ein Glykosid vom α -Typus vorlag. Im letzteren Fall kann es sich nur um ein künstliches Glykosid oder um Amygdalin handeln, denn dies letztere ist das einzige bekannte Glykosid, welches, dank seinem komplexen Aufbau, sowohl durch Emulsin wie durch Maltase gespalten wird; doch unterscheidet sich die Spaltung durch Maltase und Emulsin in charakteristischer Weise. Während das Emulsin infolge seines Gehaltes an α -Ferment (Amygdalase) und β -Ferment (Prunase) eine vollständige Zerlegung zu Traubenzucker, Benzaldehyd und Blausäure bedingt, bleibt die Zerlegung in Gegenwart von Maltase auf halbem Wege stehen, indem nur ein einziges Traubenzuckermolekül abgespalten wird. Mit anderen Worten: nur der Disaccharidkomplex im Molekül des Amygdalins wird zerlegt in ein Molekül freien und in ein Molekül an Mandelnitril gebundenen Traubenzucker, und der letztere Bestandteil, das Mandelnitrilglykosid³⁾, ist, entsprechend seiner Zugehörigkeit zum β -Typus, für Maltase nicht angreifbar⁴⁾.

Die Spaltbarkeit der Glykoside hängt aufs engste mit der besonderen Struktur des Glukoserestes zusammen. Solange derselbe bei chemischen Umwandlungen erhalten bleibt oder Aenderungen nur die endständige $\text{CH}_2\text{—OH}$ -

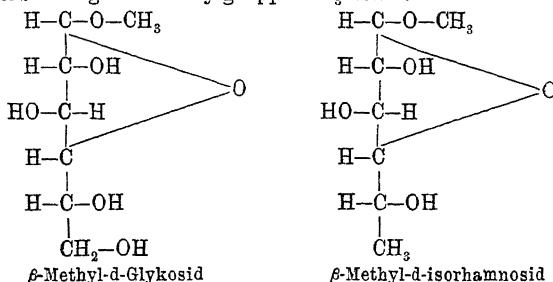
¹⁾ Pottevin, *Ann. de l'Inst. Past.* 17 (1903) 31.

²⁾ Emil Fischer, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 26 (1898) 61; siehe auch *Allg. Teil*, das Kapitel: Konstitutive Einflüsse in der Katalyse.

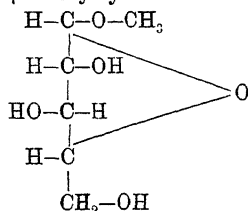
³⁾ E. Fischer, *Ber. d. chem. Ges.* 28 (1895) 1508.

⁴⁾ Siehe demgegenüber jedoch die gegenteiligen Angaben von Henry u. Auld, *Proc. Royal Soc. [Ser. B]* 76 (1905) 568, welche eine vollständige Zerlegung von Amygdalin durch Hefe, Azetondauerhefe und Preßsäfte beschreiben, die auch nach der Zerstörung der Zymase bei 58° noch beobachtet werden kann.

Gruppe betreffen, sind die glykosidischen Derivate spaltbar. So zeigten Emil Fischer u. Zach¹⁾, daß das β -Methyl-d-isorhamnosid, das sich vom β -Methyl-d-Glykosid dadurch unterscheidet, daß an Stelle der Gruppe $\text{CH}_2\text{-OH}$ der letztgenannten Verbindung die Methylgruppe CH_3 steht:



durch Emulsin ebensogut gespalten werden kann, wie das β -Methyl-d-Glykosid, obschon das β -Methyl-d-isorhamnosid als ein Homologes des wie alle Pentoside²⁾ durch Emulsin unspaltbaren β -Methylxylosids:



zu betrachten ist. Soll die Spaltbarkeit erhalten bleiben, so darf also offenbar keines der asymmetrischen Kohlenstoffatome des Glukosekerns durch irgendwelche Veränderungen betroffen werden.

Anwendung der Glykosidspaltung für die Ermittlung des Emulsins.

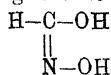
Nicht minder wichtig als zur Identifizierung, zur Konstitutions- und Konfigurationsbestimmung der Glykoside ist die durch Emulsin bzw. Prunase bedingte Spaltung für den qualitativen Nachweis dieses Fermentes selbst, die einerseits durch Feststellung des Auftretens reduzierender Substanzen erfolgt, anderseits durch die Verfolgung der Abnahme der Linksdrehung, welche sämtlichen Glykosiden eigentümlich ist und den schließlichen Uebergang der Linksdrehung in die Rechtsdrehung des Traubenzuckers. Es handelt sich also um eine Inversion, deren optisches Bild demjenigen der Rohrzuckerinversion entgegengesetzt ist. In vielen Fällen bildet der Nachweis von Glykosidspaltprodukten, insbesondere von Blausäure und von den aromatischen

¹⁾ Fischer u. Zach, Ber. d. chem. Ges. 45 (1912) 3761.

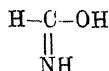
²⁾ Siehe Ryan u. Ebrill, Proc. Royal Irish Acad. 26 (1906) 5, 53.

Komponenten, die einzige Stütze für die Annahme, daß sich Emulsin ¹⁾ in irgend einer zur Untersuchung gelangenden Pflanze findet ²⁾). Doch dürfen nach den Untersuchungen von Peche ³⁾), welcher Blausäure in nichtglykosidischer Bindung in irgend einem Zusammenhang mit den Chlorophyllkörnern und auch frei in Blättern junger Pflanzen feststellte, aus dem bloßen Blausäurebefund, ohne Nachweis anderer Glykosidspaltprodukte, keine zu weitgehenden Schlüsse gezogen werden.

In theoretischer Hinsicht bemerkenswert ist, daß Treub ⁴⁾ festgestellt hat, daß die Menge der gebildeten Kohlenhydrate und der zugeführten Nitate ausschlaggebend für die Blausäuremenge ist, dürfte man doch hieraus auf eine Beziehung zur Kohlensäure- und Nitratassimilation schließen, wobei am naheliegendsten wäre, an eine Wasserabspaltung aus der Formhydroxamsäure



oder einem Reduktionsprodukt derselben



zu denken, wobei im ersteren Fall Zyansäure oder Abkömmlinge derselben, im letzteren Fall direkt Blausäure oder ihre Derivate entstehen könnten. Die von Baudisch ⁵⁾ in ihrer physiologischen Bedeutung erkannte Formhydroxamsäure bildet sich leicht durch Addition der schon unter dem Einfluß starker Bestrahlung unter Sauerstoffabspaltung aus Nitraten und Nitriten entstehenden untersalpetrigen Säure bzw. deren Salzen im Status nascens an Formaldehyd $\text{H}-\text{CH}=\text{O}$ bzw. sein Tautomeres $\text{>CH}-\text{OH}$ ⁶⁾). Verfasserin möchte jedoch die Bildung der Blausäure mehr als einen Nebenprozeß ansehen, der der Eiweißsynthese aus den erwähnten Materialien parallel läuft, oder doch nur in den Zuständen eines latenten Lebens an die Stelle der Eiweißsynthese tritt ⁷⁾. Außer bei der Bildung von Ruhezuständen (Samen) könnten ähnliche Verhältnisse vorliegen bei der von Arm-

¹⁾ Siehe die Literaturzusammenstellung über das Vorkommen des Emulsins im Pflanzenreich bei Oppenheimer, Die Fermente, Bd. 1, Leipzig 1913. 4. Aufl. S. 240—245, 247.

²⁾ Auf einen direkten mikrochemischen Nachweis des Emulsins in Pflanzen geht eine Methode von Guignard, Journ. de Bot. 4 (1890) 3, 19; Journ. Pharm., Chim. [5] 21 (1890) 233, aus, welcher durch Millons Reagens rot-orange Färbungen in den emulsinführenden Zellgruppen der Stranggewebe erhielt.

³⁾ Peche, Sitzungsber. d. Wiener Akad., Abteil. I, 121 (1912) 33.

⁴⁾ Treub, Ann. Jardin Bot. Buitenzorg [2] 8 (1912) 85.

⁵⁾ Baudisch, siehe seine zahlreichen Arbeiten in den Ber. d. chem. Ges. seit 1910 über Nitrat- und Nitritassimilation und verwandte Gebiete.

⁶⁾ Vgl. Woker, Archiv f. d. ges. Physiol. 176 (1919) 23.

⁷⁾ Vgl. die Vorstellungen von Treub, Ann. Jardin Bot. Buitenzorg 13 (1896) 1; u. Ravenna, Atti d. Reale Accad. dei Lincei Roma [5] 22, II, 44; Zentralbl. f. Biochem. 13 (1912) 368, die die Blausäure als Ausgangsmaterial der Eiweißsynthese betrachten.

strong¹⁾ beobachteten Steigerung der Blausäurebildung durch Behandeln der Blätter mit Narcoticis (ausgenommen dem hemmend wirkenden Formaldehyd).

Was die quantitative Bestimmung des Emulsins betrifft, so stößt man auch hier wieder auf die Schwierigkeiten, denen wir bei den übrigen Fermenten begegnet sind. Auch hier hängt die Aktivität des Enzyms ab von der Reaktion des Mediums, wie dies aus der folgenden Tabelle von Hudson und Paine²⁾ hervorgeht.

Konzentration von NaOH(n)	Ferment-aktivität	Konzentration von HCl(n)	Ferment-aktivität
0,005	0	0,00009	222
0,0009	138	0,00027	222
0,0005	195	0,0005	225
0,00009	215	0,0018	242
		0,005	255
0 = dest. H ₂ O	222	0,009	206
		0,011	77
		0,014	0

Die Tabelle zeigt, daß Alkalien stark schädigend in allen Konzentrationen, Säuren dagegen bis zu einer optimalen Konzentration, welche 0,005³⁾ Salzsäure entspricht, begünstigend und erst bei höheren Konzentrationen hemmend wirken⁴⁾. Für das Temperaturoptimum sind die Angaben wohl infolge der bei Emulsin verschiedener Herkunft variierenden Zusammensetzung nicht übereinstimmend. So werden sowohl 45—50°, wie 56—58° (für das α - und β -Ferment des Emulsins) angeführt⁵⁾. Als Zerstörungstemperatur wird von Hérissé^y 70°

¹⁾ Armstrong, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 82 (1910) 588.

²⁾ Hudson u. Paine, Journ. Amer. Chem. Soc. 31 (1909) 1242.

³⁾ Bzw. 0,4 · 10⁻⁵ beim Salizin [Vulquin, Compt. rend. Soc. Biol. 70 (1911) 270, 763].

⁴⁾ Merkwürdigerweise sollen Essigsäure und Ameisensäure, wie Bouchardat, Compt. rend. 20 (1845) 111, angegeben hat, wirkungslos sein. Das nämliche gilt für Neutralsalze und Schwermetallsalze, mit Ausnahme des Ammoniumkarbonats, Thorium-, Zirkon- und Kupfersulfats [Hébert, Bull. Soc. Chim. Paris 35 (1906) 1209], sowie für Antiseptika [Bourquelot u. Danjou, Compt. rend. Soc. Biol. 61 (1906) 442; Bourquelot u. Bridel, Compt. rend. 154 (1912) 944, 1375, 155 (1912) 319; Journ. Pharm. Chim. [7] 4 (1911) 385, 5 (1912) 388, 534]. Die eiweißspaltenden Fermente Pepsin und Trypsin zerstören das Emulsin [Frouin u. Thomas, Compt. rend. Soc. Biol. 60 (1906) 1039]. Siehe demgegenüber die von Claude Bernard, Leçons path. générale, Paris 1890, S. 75, festgestellte Tatsache, daß Tiere, denen gleichzeitig Amygdalin und Emulsin gereicht wird, an Blausäurevergiftung sterben, wobei jedoch eine Säurespaltung des Amygdalins im Magen zu berücksichtigen ist.

⁵⁾ Bertrand u. Compton, Bull. Soc. Chim. [4] 9 (1911) 1071.

angegeben; doch sind trockene Präparate viel widerstandsfähiger und vertragen stundenlanges Erhitzen auf 100°¹⁾. Sonnenlicht wirkt periodisch hemmend und fördernd ein²⁾, während ultraviolette Strahlen nur hemmen³⁾.

Ueber den Einfluß der spezifischen Spaltprodukte eines Glykosides (und solcher Körper, die den Spaltprodukten verwandt sind) auf die Emulsinwirkung orientiert die Angabe von Armstrong⁴⁾, daß Glukose stark, Galaktose wenig und Fruktose überhaupt nicht verzögert, sowie die im folgenden angeführte Zusammenstellung der Hemmungswirkungen, welche Fichtenholz⁵⁾ gegeben hat.

	Arbutin	Salizin	Gentio- pikrin	Amyg- dalin	Koniferin	Aukubin
Hydrochinon . .	stark	sehr schw.	sehr schw.	sehr schw.	—	—
Gallussäure . .	vollständ.	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig	fast vollst.
Tannin	sehr stark	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig

Die Spaltprodukte und die denselben am nächsten stehenden Körper scheinen danach eine besonders ausgesprochene Hemmungswirkung auszuüben, eine Wirkung, die von Herzog⁶⁾ in der von ihm abgeleiteten Formel berücksichtigt worden ist. Auch Auld⁷⁾ gibt für die Spaltung des Amygdalins durch Emulsin an, daß alle drei Spaltprodukte⁸⁾ hemmen. Endlich führen die grundlegenden Untersuchungen von Tammann⁹⁾ zu der Annahme einer hemmenden Wirkung der Endprodukte der Glykosidspaltung. Nicht unmöglich wäre es, daß auch die spezifische Hemmungswirkung, welche das im Tierkörper durch Immunisierung mit Emulsin erzeugte Antiemulsin¹⁰⁾ auf die Emulsin-

¹⁾ Bull, Ann. Chem. 69 (1849) 145.

²⁾ Marino u. Sericano, Arch. di Fisiol. 8 (1910) 40.

³⁾ Giaja, Compt. rend. Soc. Biol. 72 (1912) 2.

⁴⁾ Armstrong, Proc. Royal Soc. London 73 (1904) 500, 516, 526.

⁵⁾ Fichtenholz, Journ. Pharm. Chim. 30 (1909) 199.

⁶⁾ Herzog, Koninkl. Akad. van Wetensch. Amsterdam (1903) 332.

⁷⁾ Auld, Journ. Chem. Soc. London 93 (1908) I, 1251 u. II, 1276, 95 (1909) 929.

⁸⁾ Bei der Spaltung des Amygdalins mittels Emulsin aus *Phaseolus lunatus* gibt dagegen der nämliche Forscher an, daß geringe Mengen Blausäure förderlich sind.

⁹⁾ Tammann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 16 (1891) 298; Zeitschr. f. physik. Chem. 18 (1895) 426, und loc. cit. im *Allg. Teil*.

¹⁰⁾ Beitzke u. Neuberg, Virchows Archiv 183 (1906) 169; Zeitschr. f. Immun. 2 (1909) 645; Neuberg u. Ohta, Biochem. Zeitschr. 54 (1913) 480; Hilde-

wirkung ausübt, auf eine natürliche Hemmungswirkung durch die angehäuften Spaltprodukte eines im Organismus vorhandenen, durch Emulsin spaltbaren glykosidischen Körpers oder Kohlenhydrats hinausläuft, wofür insbesondere die von Neuberg und Beitzke (loc. cit.) beobachtete Beschleunigung der synthetischen Wirkung des Emulsins durch sein „Antiferment“ herangezogen werden könnte. Es würde sich dann im Organismus derselbe Vorgang der Glykosidsynthese abspielen können wie im Reagenzglas, sobald eben die Spaltprodukte eines Glykosids sich in solchem Maße angehäuften haben, daß das Massenwirkungsgesetz bei den beständig nebeneinander herlaufenden Gegenreaktionen (Spaltung und Rückbildung) ein Ueberwiegen der Synthese¹⁾ bewirkt, welche dann infolge des optisch asymmetrischen Charakters des Fermentmoleküls, oder — an dessen Stelle optisch aktiver Alkaloide²⁾ — zu d-Benzaldehydzyanhydrin führt. Gegenüber der Auffassung eines einheitlichen spaltenden und synthetisierenden fermentativen Prinzips nimmt Rosenthaler³⁾ ein besonderes, im Emulsin enthaltenes synthetisierendes Ferment, die σ -Oxynitrilase an.

Die genannten Einflüsse, welche für die Geschwindigkeit des Ablaufs der Glykosidspaltung in Gegenwart von Emulsin in so hohem Grade in Betracht fallen, lassen es begreiflich erscheinen, daß auch beim Emulsin die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Konzen-

brandt, Virchows Archiv 131 (1893) 12, 26, 184 (1906) 325; Hämäläinen u. Sjöström, Skand. Arch. Physiol. 24 (1911) 113; siehe gegenüber diesen positiven Befunden den negativen von Bayliß, Journ. Physiol. 43 (1912) 455.

¹⁾ Siehe über Glykosidsynthesen unter dem Einfluß des Emulsins: van't Hoff, Berliner Akad. Ber. 48 (1910) 963; siehe auch Derselbe, Ebenda 42 (1909) 1065. van't Hoff hat auch die Bedeutung der Konstitution eines an der Glykosidbildung teilnehmenden Alkohols erkannt, indem er feststellte, daß die Grenze bei primären Alkoholen oberhalb 50%, bei tertiären Alkoholen unterhalb 50% liegt, daß also eine ähnliche Beziehung besteht, wie sie Menschutkin, Ann. Chim. Phys. [5] 20 (1880) 229, 23 (1881) 14, 30 (1883) 81, für die Esterifikationsgrenze von primären, sekundären und tertiären Alkoholen festgestellt hat. Siehe ferner über Glykosidsynthesen mittels Emulsin: Bayliß, Proc. Phys. Soc. 16 (1912) III; Journ. Physiol. 43 u. 44 (1912). Beim Salizin blieb die Synthese aus [Bourquelot u. Bridel, Journ. Pharm. Chim. [7] 5 (1912) 12, 569, 6 (1912) 13, 56, 97, 164, 193, 442; Bertrand u. Compton, Compt. rend. 154 (1912) 1646].

²⁾ Das r-Benzaldehydzyanhydrin wurde von Bredig u. Fiske, Biochem. Zeitschr. 46 (1912) 7, mittels Chinin erhalten, während die Verwendung von Chinidin als Katalysator zum l-Zyanhydrin führte; siehe ferner Fajans, Zeitschr. f. physik. Chem. 75 (1910) 232.

³⁾ Rosenthaler, Biochem. Zeitschr. 14 (1908) 238, 17 (1909) 256, 19 (1909) 186, 26 (1910) 1, 28 (1910) 408, 50 (1913) 486; Archiv d. Pharm. 248 (1910) 105; 251 (1913) 85; Zeitschr. f. physik. Chem. 73 (1910) 232.

ation des Substrates keineswegs klar zutage tritt. Zur Verwirrung ist auch hier geradeso wie bei der Invertase der Umstand beigetragen, daß die durch die Multirotation der Glukose bedingte Fehlerquelle außer acht gelassen worden ist. Hier war es ebenfalls Hudson¹⁾, der in Gemeinschaft mit Paine auf diesen Punkt hingewiesen und damit die Rückkehr von den komplizierten Formeln, wie sie Henri²⁾ ableitet, zu der einfachen Formel einer monomolekularen Reaktion fand; ist es doch nach den Tammannschen Versuchen den Anschein, als ob es sich bei 25° um eine Reaktion erster Ordnung handle³⁾.

Die Natur des zu spaltenden Substrats scheint für die Resultate belanglos zu sein, da Versuche mit Salizin, Amygdalin, Koniferin und Arbutin das nämliche ergaben. Dagegen muß die Herkunft des Emulsins berücksichtigt werden. Doch herrschen hier Unstimmigkeiten in der Deutung der erhaltenen Resultate. Während Oppenheimer⁴⁾ nach Versuchen von Auld⁵⁾ angibt, daß bei der Anwendung von Emulsin aus *Phaseolus lunatus* der Reaktionsverlauf für Amygdalin wie für Salizin nicht der monomolekularen Gleichung gehorcht, sondern der Formel:

$$k_1 = \frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x},$$

gibt Euler⁶⁾ gerade umgekehrt: „Bei den Versuchen des gleichen Forschers (Auld) über die Spaltung des Salizins durch ein in *Phaseolus lunatus* enthaltenes Emulsin (*Phaseolunataze*) kann man vielleicht von einer Konstanz der *k*-Werte⁷⁾ sprechen.“

Kompliziert werden die Verhältnisse offenbar noch dadurch, daß es sich um die Uebereinanderlagerung mehrerer Enzymwirkungen handelt; denn Armstrong und Horton⁸⁾ haben ja die Heterogenität aus Mandeln gewonnener Emulsinpräparate erwiesen.

Was die Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Enzymmenge betrifft, so besteht nach Visser⁹⁾ angenäherte Pro-

¹⁾ Hudson u. Paine, Journ. Amer. Chem. Soc. 31 (1909) 1242.

²⁾ Henri, Lois générales de l'action des diastases, Thèse Paris 1903.

³⁾ Vgl. Euler, Allgemeine Chemie der Enzyme, Wiesbaden 1910, S. 122; siehe demgegenüber Oppenheimer, Die Fermente, Allg. Teil, 4. Aufl., Leipzig 1918, S. 979.

⁴⁾ Oppenheimer, loc. cit. Allg. Teil, 4. Aufl., S. 984 u. 985.

⁵⁾ Auld, Journ. Chem. Soc. London 93 (1908) 1251, 1276.

⁶⁾ Euler, loc. cit. S. 123.

⁷⁾ Der Formel für monomolekulare Reaktionen.

⁸⁾ Armstrong u. Horton, Proc. Royal Soc. London 80 (1908) 326.

⁹⁾ Visser, Koninkl. Akad. van Wetensch., Amsterdam, Sitzungsber. vom 10. Februar 1904: Zeitschr. f. physik. Chem. 52 (1905) 257.

portionalität, indem einem Verhältnis der Enzymquantitäten von 1:2:4 ein Verhältnis der Anfangsgeschwindigkeiten von 1:2,3:3,9 entspricht. Um diese Gesetzmäßigkeit zur quantitativen Bestimmung des Emulsins zu benutzen, muß jedoch dem Umstand Rechnung getragen werden, daß Proportionalität nur für relativ geringe Enzymquantitäten besteht, wie dies die Versuche von Auld¹⁾ gezeigt haben:

Enzymmenge	2	3	4	6	12	25	50 cem
Nach 10 Minuten hydrolysiert in Prozenten	3,7	6,05	8,7	12,5	17,2	21,6	24,1

sowie die Versuche von Armstrong und Horton²⁾:

Enzymmenge	10	20	40	60 cem
Geschwindigkeitskonstante $k \cdot 10^4$	107	212	279	385

Das Myrosin.

Außer den zahlreichen zu den Glykosidasen gerechneten Fermenten³⁾, die teils mit der Prunase des Emulsins identisch sein dürften, teils von ihr mehr oder weniger große — wohl auch hier durch spezifische Anpassung entstandene — Abweichungen zeigen, kommt dann namentlich einer Glykosidase von ausgesprochener Eigenart eine größere Bedeutung zu. Es ist das von Bussy⁴⁾, sowie von Boutron und Frémy⁵⁾ aufgefundene Myrosin (Myrosinase), ein Ferment⁶⁾, das in fast allen Kruziferen⁷⁾ vorkommt und durch die Fähigkeit ausgezeichnet ist, die zahlreichen zueinander in verwandtschaftlicher Beziehung stehenden Senfölglykoside in ihre Bestandteile zu zerlegen. Das Glykosid, bei welchem zuerst die in Gegenwart des Myrosins stattfindende Spaltung festgestellt wurde, ist das myronsaure

¹⁾ Auld, loc. cit. Fußnote 5, vorige Seite, S. 1270.

²⁾ Armstrong u. Horton, loc. cit. Fußnote 8, vorige Seite.

³⁾ Siehe im vorigen.

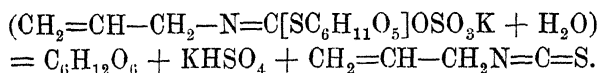
⁴⁾ Bussy, Ann. Chem. 34 (1840) 223.

⁵⁾ Boutron u. Frémy, Ann. Chem. 34 (1840) 230.

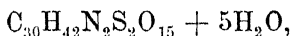
⁶⁾ Ueber die Identität aller in Kruziferen vorkommenden Myrosinasen siehe Smith, Zeitschr. f. physiol. Chem. 12 (1886) 432.

⁷⁾ Capsella bursa pastoris enthält keine Myrosinase.

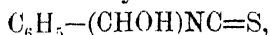
Kali oder Sinigrin, nachdem lange vorher schon Thibierge¹⁾, Thomson²⁾, Fauré³⁾, Boutron und Robiquet⁴⁾, Lefebvre (1660), Boerhave (1775)⁵⁾, Simon⁶⁾, Hubatka⁷⁾, Wertheim⁸⁾, Pleß⁹⁾, Vollrath¹⁰⁾, Hofmann¹¹⁾, Schmidt¹²⁾ sein Spaltprodukt, das Senföl, in Pflanzensamen nachgewiesen hatten. Die Spaltung des im schwarzen Senf, in Brassika, Armorazea und Kochlearia vorkommenden myronsauren Kaliums, mit dessen Aufklärung sich Ludwig und Lange¹³⁾, sowie Will und Körner¹⁴⁾ und in unserer Zeit insbesondere Gadamer¹⁵⁾ befaßt haben, vollzieht sich nach der Formel:



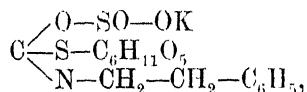
Das komplizierter zusammengesetzte Glykosid des weißen Senfs, das Sinalbin¹⁶⁾



zerfällt unter dem Einfluß des Myrosins in Oxybenzylsenföl



eine hochmolekulare Sulfonsäure und Traubenzucker¹⁷⁾; das Glykonasturtiin (Gadamer)



¹⁾ Thibierge, Journ. Pharm. 5 (1819) 439.

²⁾ Thomson, Journ. Pharm. 5 (1819) 448.

³⁾ Fauré, Journ. Pharm. 17 (1831) 299.

⁴⁾ Boutron u. Robiquet, Journ. Pharm. 17 (1831) 279.

⁵⁾ Boerhave, siehe Spatzier, Jahrb. f. wiss. Bot. 25 (1893) 93.

⁶⁾ Simon, Pogg. Ann. 50 (1840) 377.

⁷⁾ Hubatka, Ann. Chem. 47 (1843) 157.

⁸⁾ Wertheim, Ebenda 52 (1844) 52.

⁹⁾ Pleß, Ebenda 58 (1846) 36.

¹⁰⁾ Vollrath, Archiv d. Pharm. [2] 148 (1871) 156.

¹¹⁾ M. W. Hofmann, Ber. d. chem. Ges. 7 (1874) 509.

¹²⁾ Schmidt, Ebenda 10 (1877) 187.

¹³⁾ Ludwig u. Lange, Zeitschr. f. Pharm. 3, 430, 577; zitiert nach Oppenheimer, loc. cit. Spez. Teil, 1909, S. 63.

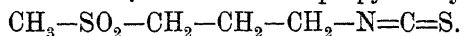
¹⁴⁾ Will u. Körner, Ann. Chem. 125 (1863) 257.

¹⁵⁾ Gadamer, Journ. Pharm. Chim. [6] 4 (1896) 462; Archiv d. Pharm. 235 (1897) 44, 577; siehe auch Gadamer, Archiv f. d. ges. Physiol. 137 (1911) 453.

¹⁶⁾ Will u. Laubenheimer, Ann. Chem. 199 (1879) 162.

¹⁷⁾ Ueber weitere durch Myrosinase spaltbare Glykoside siehe Gadamer, Archiv d. Pharm. 237 (1899) 92, 239 (1901) 233; Ber. d. chem. Ges. 32 (1899) 2335; M. Kunze, Archiv d. Pharm. 245 (1908) 660; Hildebrandt, Hofmeisters Beitr. 7 (1906) 438.

welches sich in Nasturtium findet, spaltet sich in ähnlicher Weise unter Bildung von Phenyläthylsenfö, und das von Schneider und Lohmann¹⁾ im Goldlack aufgefundene Glykosid liefert bei der Spaltung mittels Myrosinase neben Kaliumsulfat und Traubenzucker das als Cheirolin bezeichnete γ -Thiokarbidpropylmethylsulfon:



Außerdem werden eine Anzahl noch nicht näher bekannte Glykoside durch Myrosinase gespalten. Dagegen bleibt die Spaltung von α - wie von β -Methylglykosid aus²⁾.

Der charakteristische Geruch der Senföle ist das beste Hilfsmittel³⁾ zum qualitativen Nachweis des Myrosins in den Pflanzen. Spatzier⁴⁾ geht bei diesem qualitativen Nachweis so vor, daß er dem auf Myrosin zu prüfenden Pflanzensaft etwas myronsaures Kali hinzugibt. Der auftretende Senfölguch verrät dann die Gegenwart des Fermentes⁵⁾. Selbstverständlich läßt sich diese empfindliche Geruchsmethode nicht allein zur Feststellung derjenigen Pflanzen benutzen, die Träger des Myrosins sind, sondern sie dient auch dazu, die myrosinführenden einzelnen Pflanzenteile zu erkennen, ja sie ist sogar im Zusammenhang mit mikrochemischen Farbenreaktionen⁶⁾ geeignet, den Sitz des Enzyms im feinsten Bau der Gewebe in den zuerst von Heinricher⁷⁾ beobachteten sog. „Eiweißschläuchen“ oder „Myrosinschläuchen“ ausfindig zu machen, wie dies Spatzier (loc. cit.) im Anschluß an Untersuchungen von Guignard⁸⁾ gezeigt hat.

Die quantitative Bestimmung der Myrosinase erfolgt nach Tammann⁹⁾ durch Titration des durch das Ferment aus dem myronsauren Kalium in Freiheit gesetzten Kaliumbisulfats mittels $\frac{1}{50}$ normaler Natronlauge und Karminsäure als Indikator an Proben, die der Mischung des zu prüfenden Pflanzensaftes und des Glykosids entnommen sind.

¹⁾ Schneider u. Lohmann, Ber. d. chem. Ges. 45 (1912) 2954.

²⁾ Emil Fischer, Ebenda 27 (1894) 3483; Gesammelte Abhandl. S. 849.

³⁾ An Stelle der Geruchsprobe hat sich Spatzier auch der Orzin-Salzsäurereaktion bedient.

⁴⁾ Spatzier, Jahrb. f. wiss. Bot. 25 (1893) 93.

⁵⁾ Wenn der Pflanzensaft schon vor dem Zusatz von myronsaurem Kali den charakteristischen Geruch zeigt, so muß er erst bis zum Verschwinden des Geruchs erwärmt werden.

⁶⁾ Mit Orzin und Salzsäure (Spatzier), und Millons Reagens (Heinricher, Guignard).

⁷⁾ Heinricher, Mitteil. d. bot. Inst, Graz 1886/87.

⁸⁾ Guignard, Journ. de Bot. (1890) 385.

⁹⁾ Tammann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 16 (1892) 300.

Zusammenfassung.

Fassen wir die für den Analytiker wichtigsten Punkte aus dem Gebiet der saccharifizierenden Fermente kurz zusammen, so sind es die folgenden:

I. Die saccharifizierenden Fermente dienen der Analyse der Substrate, die sie zu spalten vermögen:

1. durch Feststellung, ob ein auf seine Natur zu prüfendes Kohlenhydrat oder Glykosid durch ein bekanntes Ferment angegriffen wird. Diese Feststellung erfolgt:

a) durch den Nachweis der Verminderung des Substrates und deren quantitative Messung;

b) durch den Nachweis der auftretenden Spaltprodukte und deren quantitative Messung.

ad a) Die Verminderung fester Substrate ergibt sich 1. aus deren Auflösung (Dellenbildung, makroskopisch und mikroskopisch nachweisbare Arrosions- und Verflüssigungserscheinungen). 2. Die Verminderung gelöster Substrate ergibt sich aus der Aenderung chemischer und physikalischer Eigenschaften, wie Reduktionsvermögen, Reaktion mit Jod, Drehung der Polarisationssebene, Brechungsvermögen, Viskosität, Volumen.

ad b) Der Nachweis auftretender Spaltprodukte erstreckt sich:

A. Auf die Feststellung, daß solche vorhanden sind, und auf die quantitative Verfolgung ihres Anwachsens:

α) durch die Zunahme des Reduktionsvermögens;

β) durch die Aenderung der Drehung der Polarisationssebene;

γ) durch die Aenderung des Brechungsvermögens;

δ) durch die Zunahme von Molekülen in der Lösung parallel gehende Vermehrung des osmotischen Druckes und der Gefrierpunkterniedrigung.

B. Auf die Feststellung des Auftretens an ein oder mehrere Spaltprodukte gebundener Reaktionen, und zwar:

α) Farbenreaktionen wie die Erythroextrinreaktion bei Jodzusatz, die Seliwanovsche Fruktoseprobe, die Zuckerreaktionen von Moore-Heller und Rubner, die große Zahl der auf die Gegenwart freier Aldehyd- oder Ketongruppen reagierenden Reduktionsproben, und bei Glykosiden die für bestimmte Phenole charakteristischen Farbenreaktionen.

β) Geruchsreaktionen. Dieselben sind für den Nachweis der Senfölglykoside von ausschlaggebender Bedeutung.

γ) Die Osazonprobe, welche sicherer als irgend eine andere Reaktion

die Identifizierung der Spaltprodukte eines Polysaccharids und damit dieses selbst gestattet.

- δ) Die Gärprobe am Spaltgemisch oder den isolierten Komponenten, durch welche sich an Hand der Kohlensäureentwicklung feststellen läßt, ob und in welchem Maße ein Polysaccharid aus gärfähigen (Glukose, Fruktose, Maltose) oder nicht gärfähigen Bausteinen (Pentosen, Isomaltose) aufgebaut ist.
- ε) Die Leuchtbakterienprobe, durch welche sich ein Substrat bei der fermentativen Spaltung als glukosehaltig erweist.

2. als Hilfsmittel der analytischen Praxis bei Kohlenhydratgemischen, wo es sich darum handelt, die generelle aufspaltende Wirkung der Wasserstoffionen gegenüber den ätherartigen Bindungen der Kohlenhydrate unter sich (Polysaccharide) oder mit Phenolen (Glykoside) durch eine streng spezifische zu ersetzen. Hierdurch wird es möglich, im Gemisch mehrerer Kohlenhydrate und Glykoside sukzessive die einzelnen Komponenten durch das an ihre konstitutive Eigenart am vollkommensten angepaßte, spaltende Enzym herauszulösen und gesondert zur Bestimmung zu bringen nach einer der vorerwähnten Methoden. Liegt also z. B. ein Gemisch von Rohrzucker und Milchsucker vor, so wird die nach Invertasebehandlung erhaltene Abnahme der Rechtsdrehung oder die Zunahme des Reduktionsvermögens ein Maß sein für den Rohrzuckergehalt des Gemisches, an welche Bestimmung sich dann in diesem Fall die Spaltung des Restes, oder in komplizierteren Fällen der Reihe nach die entsprechende spezifische Spaltung der einzelnen vorhandenen Kohlenhydrate anzuschließen hat.

II. Die fermentative Aufspaltung der Polysaccharide und Glykoside dient der Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Fermentwirkung, welche letztere sich aus dem unbekannten wahren Fermentgehalt und den aktivierenden und paralyisierenden Einflüssen des Milieus zusammensetzt. Identifizierung und Bestimmung der Fermente erfolgen nach genau denselben Verfahren, wie sie für die fermentative Analyse der Kohlenhydrate und Glykoside unter I 1 einzeln angeführt sind. Daß dort das Substrat unbekannt, das Ferment dagegen bekannt ist, hier dagegen mit bekanntem Substrat das unbekannte Ferment ermittelt wird, ist natürlich für die in Frage kommende Wirkung und ihre Bestimmung einerlei.

2. Proteasen (proteolytische Fermente).

Von mindestens ebenso großer Bedeutung wie die saccharifizierenden Fermente sind jene, denen die Aufgabe zufällt, die ver-

schiedenen Eiweißkörper von den einfachsten bis zu den kompliziertesten zur Resorption für den über diese Fermente verfügenden Organismus vorzubereiten, indem unter ihrem Einfluß hochkomplizierte, zum Teil auch eine Schwerlöslichkeit der Substanz bedingende Moleküle in einfache Bausteine zerfallen. Daß mit diesem Zerfall ein doppelter Zweck erreicht wird, fällt nirgends so sehr in die Augen wie im Gebiet der Proteasen. Denn einerseits werden durch den Aufspaltungsprozeß kolloide, zur Membrandiffusion ungeeignete Stoffe in eine diosmierbare, für die Zelle resorbierbare Form gebracht, und andererseits kann ein Organismus, gleichviel welcher Art, erst nach der Aufspaltung die Bestandteile des Nährmaterials so zusammensetzen, daß arteigenes Eiweiß entsteht.

Das Hilfsmittel, dessen sich ein Organismus bei der Resynthese bedient, ist gleichfalls fermentativer Natur; und da, wie im *Allgemeinen Teil*¹⁾ und in der Einleitung des Abschnitts über die hydrolysierenden Fermente ausgeführt worden ist, die Theorie verlangt, daß ein Ferment den Verlauf umkehrbarer chemischer Reaktionen je nach den Konzentrationsverhältnissen sowohl im Sinne von links nach rechts, wie im Sinne von rechts nach links zu beschleunigen vermag, so dürfte man ebenfalls Proteasen für den Wiederaufbau von Zelleiweiß verantwortlich machen, eine theoretische Forderung, die durch den Nachweis der als Plasteine und Koagulosen²⁾ bezeichneten proteinartigen Niederschläge in Ferment- und Säurespaltungsgemischen der Eiweißkörper in Gegenwart von Lab, Papayotin, Magen- und Pankreassaft ihre experimentelle Grundlage erhalten hat. Damit steht auch eine Beobachtung Taylors³⁾ durchaus in Uebereinstimmung, wonach in der konzentrierten Lösung der Aminosäuren, die durch Verdauung eines Protamins mittels eines trypsinartigen Fermentes aus der Leber einer Muschel entstanden waren, unter dem Einfluß des nämlichen Trypsins nach längerer Zeit Protamin zurückgebildet worden war.

Oppenheimer hat allerdings in seinem vorzüglichen Werk über die Fermente noch in der 3. Aufl. (Spez. Teil, 1909, S. 204) diesen Befund mit der Bemerkung abgetan: „Die Sache ist im höchsten Maße unwahrscheinlich.“ Doch kann ich mich dieser, vielleicht durch die unbewußte Gegnerschaft des Biologen zur Stellungnahme der physikalischen Chemie zu diesem Problem veranlaßten harten Kritik — die im übrigen in der 4. Aufl. (loc. cit. Fußnote 2 diese Seite) einem

¹⁾ Siehe das Kapitel: Katalyse und Reversibilität.

²⁾ Literatur siehe Oppenheimer, loc. cit. Bd. 2, 4. Aufl., 1913, S. 548 bis 552.

³⁾ Taylor, Journ. Biol. 3 (1907) 87; On Fermentation Berkeley, 1907, S. 152.

weit weniger ablehnenden Standpunkt gewichen ist — nicht anschließen, da die Untersuchung nicht nur mit durchaus berechtigten wissenschaftlich erwiesenen Voraussetzungen rechnet, sondern auch durch das zutage geförderte Tatsachenmaterial von Tag zu Tag mehr gestützt wird. Sind doch den Versuchen über eine direkte Umkehrung der fermentativen Tätigkeit und der Plasteinbildung auch jene Fälle anzureihen, bei welchen die Eiweißspaltprodukte eine ausgesprochene Hemmungswirkung auf den Verdauungsprozeß ausüben. So fand Kühne¹⁾ nach Wegschaffung der Peptone durch Dialyse, daß das Pepsin bei dieser zweiten Einwirkung fast ebensoviel Fibrin zu lösen vermochte wie das erste Mal. Ebenso hat Bayliss²⁾ bei der tryptischen Spaltung des Kaseins starke Hemmungen durch die gebildeten Aminosäuren, namentlich Leuzin und Glykokoll, festgestellt³⁾. Der Umstand, daß nach Abderhalden und Gigon⁴⁾ auch andere natürliche Aminosäuren als die Spaltprodukte hemmen, spricht nicht dagegen. Hier muß wohl derselbe Grund wie für die im folgenden besprochene Kohlenhydrathemmung des Pepsins herangezogen werden. Für die hemmenden Wirkungen der Aminosäuren ist offenbar eine bestimmte Konzentrationsgrenze erforderlich; denn wie Chodat⁵⁾ beim l-Tyrosinanhidrid und Glyzyl-l-Tyrosinanhidrid gezeigt hat, beschleunigen die Aminosäuren die Verdauung, wenn sie in äußerst verdünnter Lösung vorhanden sind⁶⁾.

Umkehrungen der Fermentwirkung sind übrigens geeignet, das schon von Schwann⁷⁾ aufgefundene und von vielen anderen, so von Brücke⁸⁾, Schiff⁹⁾, Ebstein und Grützner¹⁰⁾ bestätigte oder neu entdeckte Gesetz zu erklären, daß mit steigendem Pepsingehalt die verdauten Eiweißmengen anfänglich zunehmen, daß aber diese Zunahme nach Passierung eines maximalen Wertes in das Gegenteil — eine mit steigenden Pepsinmengen zunehmende Verminderung des verdauten Eiweißes — umschlägt.

Daß das resynthetisierte Eiweiß artgleich ist, ja daß die kleinste Zelle die ihr zugeführten Abbauprodukte genau der Zusammensetzung ihres eigenen Eiweißes entsprechend kombiniert, erklärt sich vielleicht

¹⁾ Kühne, Lehrb. d. physiol. Chem., 1866, S. 39.

²⁾ Bayliss, Arch. Science Biol., Suppl. 9, 261, zitiert nach Euler, loc. cit. S. 102.

³⁾ Dagegen zeigte Euler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51 (1907) 213, daß bei der Wirkung des Erepsins auf Glyzylglyzin keine bemerkenswerte Verzögerung durch Glykokoll stattfindet.

⁴⁾ Abderhalden u. Gigon, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53 (1907) 251.

⁵⁾ Chodat, Arch. Sciences Phys. nat. 26 (1907) 112.

⁶⁾ Vgl. ferner Bayliss, Arch. Sciences Biol., Suppl. 11, Petersburg 1904.

⁷⁾ Schwann, Ueber das Wesen des Verdauungsprozesses, Johannes Müllers Archiv f. Anat. u. Physiol. (1836) 90.

⁸⁾ Brücke, Sitzungsber. d. Kaiserl. Akad. d. Wiss. Wien 37 (1859) 131.

⁹⁾ Schiff, Leçons sur la Physiol. de la digestion 2 (1867) leç. 27.

¹⁰⁾ Ebstein u. Grützner, Pfügers Archiv 6 (1872) 1.

in einfacher Weise durch die Besonderheiten der Enzyme, die von Art zu Art, selbst von Individuum zu Individuum und in ihren feinsten Modifikationen von Zelle zu Zelle variieren können.

Aber die synthetisierende Funktion der Proteasen, für die allein jene minimsten Schwankungen in der Zusammensetzung in Betracht fallen, besitzt für den Analytiker vorläufig noch viel geringere Bedeutung als die Spaltungen, welche ihm die Gegenwart einer Protease und die Intensität ihrer Wirkung in irgendeinem Saft der unzähligen auf Eiweißnahrung angewiesenen Pflanzen und Tiere anzeigen¹⁾.

In bezug auf ihr Spaltungsvermögen sind die Proteasen auch nicht alle gleichartig beschaffen; wenn auch zum Unterschied von der Synthese bei einer zu Ende geführten Spaltung in den großen Zügen die nämlichen Körper, die vornehmlich aus Aminosäuren, wie Leuzin, Alanin, Tyrosin, Tryptophan, bestehenden kristallinen Spaltprodukte gebildet werden, so sind doch nicht wenige Variationen dadurch möglich, daß bei den einzelnen Fermenten die Umsetzung nicht die ganze Stufenleiter des Eiweißabbauprozesses umfaßt, sondern entweder bei Zwischenprodukten stehen bleibt oder erst bei diesen einsetzt und deren Spaltung völlig zu Ende führt.

Den ganzen Aufspaltungsprozeß von den genuinen Eiweißkörpern an bis zu den kristallinen Spaltprodukten umfaßt nur die — im übrigen wahrscheinlich zwei Fermentarten enthaltende — Gruppe der Trypsasen, deren typischer Repräsentant das Trypsin der Pankreasdrüse ist. Doch bestehen auch für die Spaltungsfähigkeit des Trypsins Einschränkungen, die sich sowohl in bezug auf die Angreifbarkeit hochmolekularer Eiweißkomplexe wie in bezug auf die Angreifbarkeit bestimmter einfacherer Zwischenprodukte äußern. Vor allem zeigt lebendes Eiweiß eine ungemein hohe Resistenz gegenüber dem Trypsin. Daß phagozytierte Bakterien in den Leukozyten am Leben bleiben und sich darin sogar vermehren können, trotzdem sie unter dem Einfluß des als Leukoprotease bezeichneten tryptischen Enzymes stehen, ist ja der Metschnikoffschen Phagozytoselehre zur Klippe geworden.

Aber auch totes Eiweiß wird nicht in allen Fällen vom Trypsin angegriffen; so erwähnt Hedin²⁾ die Resistenz von mit Ammonium-

¹⁾ Ueber das Vorkommen von Proteasen siehe Oppenheimer, *Die Fermente*, 4. Aufl., Leipzig 1913, S. 422—435, 440, 463, 464, 466—468, 487—498, 509—520, 522, 536—540, 600—618.

²⁾ Hedin, *Journ. Physiol.* 32 (1905) 468, 34 (1906) 370; *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 57 (1908) 471; siehe ferner Oppenheimer u. Michaelis, *Archiv f. Anat. u. Physiol., Suppl.* (1902) 336, 436; Oppenheimer, *Ebenda* 4 (1904) 259; Op-

sulfat ausgefälltem Serumalbumin. Was das Verhalten des Trypsins gegenüber den Zwischenprodukten der Eiweißspaltung anbelangt, so wird dasselbe bestimmt durch konstitutive Einflüsse in dem betreffenden Polypeptidmolekül.

Welche Umstände für die Spaltbarkeit eines Polypeptids durch Trypsin in Betracht kommen, wurde schon im *Allgemeinen Teil*¹⁾ besprochen. Diese Grenzen, welche der abbauenden Fähigkeit des Trypsins gezogen sind, werden aber in der Natur meist nicht fühlbar, weil das Vorhandensein anderer Fermente oder unter Umständen vielleicht auch nur ein Reaktionswechsel des Mediums die bestehenden Unvollkommenheiten ausgleicht. Die eine Klasse dieser Fermente greift dort ein, wo das Trypsin schon bei der Einleitung der Hydrolyse auf Schwierigkeiten stößt. Solche Enzyme vom Typus des Pepsins — die Pepsinasen — nehmen dem Trypsin die schwierige Arbeit der ersten Spaltungsphasen ab. Durch eine selbst minimale Pepsinverdauung wird die Widerstandsfähigkeit des intakten genuinen Eiweißmoleküls gebrochen; die Trypsinspaltung erfolgt rascher, als wenn kein Pepsin zugegen ist, wie dies Abderhalden²⁾ beim Edestin zeigen konnte. Aber auch im Spätverlauf des Eiweißabbaues erwachsen dem Trypsin Hilfskräfte in Form der sog. Peptasen oder peptolytischen Fermente von der Art des Erepsins. Ihre Wirkung setzt an den Bruchstücken von polypeptidartiger Struktur ein, die nach der Einwirkung des Trypsins als halbverdaute Eiweißreste zurückgeblieben sind. Unter dem Einfluß der Peptasen werden auch sie in die kristallinen Spaltprodukte übergeführt. Die Peptasen und Pepsinasen verhalten sich gegenüber den Polypeptiden als strikte Gegensätze, indem die ersteren sämtliche, die letzteren keinen einzigen Repräsentanten dieser Körperklasse anzugreifen vermögen.

Für die Untersuchung eines auf die Fähigkeit zur Eiweißspaltung zu prüfenden Saftes tierischen oder pflanzlichen Ursprungs ist nun offenbar nach dem Vorausgeschickten die Beantwortung folgender Fragen von Wichtigkeit:

1. Liegt eine Protease vor?
2. Wenn ja, um was für eine Protease handelt es sich?
3. Wieviel von der betreffenden Protease enthält das Untersuchungsmaterial?

penheimer u. Aron, Hofmeisters Beitr. 4 (1904) 279; Oppenheimer u. Rosenberg, Ebenda 5 (1904) 412.

¹⁾ *Allg. Teil*, S. 512 u. 513.

²⁾ Abderhalden u. Gigon, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53 (1907) 119.

Der Nachweis der Proteasen.

Für die Beantwortung der ersten Frage stehen wie bei der Diastaseprüfung zwei Wege offen, indem man in Verfolgung des Reaktionsverlaufs entweder auf die Verminderung resp. das völlige Verschwinden des Ausgangsmaterials oder auf die Zunahme der Umsetzungsprodukte abstellt.

Bei den Nachweismethoden der ersten Art wird dementsprechend ein der Proteasewirkung zugängliches Material der zu untersuchenden Flüssigkeit zugesetzt und beobachtet, ob dasselbe eine Veränderung erleidet.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden sind durch die verschiedenen Stoffe begründet, an denen eine solche Veränderung festgestellt wird.

Für die Prüfung des Harns und der Fäzes auf Pepsin und Trypsin, für den Nachweis von Pepsin im Magensaft usw. kommt z. B. eine Fibrinflocke in Anwendung, deren Verdauung (bei Bruttemperatur) dadurch noch augenfälliger gemacht werden kann, daß man sie zuvor mit Karmin, Magdalarot, Kongorot oder Spritblau färbt, je nach der Protease, auf die man prüft, bzw. je nach der für diesen Nachweis notwendigen Reaktion. Der Farbstoff geht dann entsprechend der Menge des verdauten Eiweißes in Lösung, ein Umstand, der die Methode nicht allein zum Nachweis, und zwar der geringsten Pepsinmengen¹⁾, sondern zugleich zur quantitativen Fermentbestimmung tauglich macht²⁾.

Karmin dient für den Nachweis des Pepsins, die drei anderen Farbstoffe für den Nachweis des Trypsins³⁾. Die Färbung erfolgt nach Sahli⁴⁾ durch Einlegen der zerschnittenen, gut ausgewaschenen Fibrinstränge für 1—2 Tage in die $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ %ige ammoniakalische Karmin- oder die entsprechenden anderen (konzentrierten neutralen) Farblösungen, nachdem die Fibrinstücke zuvor einige Tage in Spiritus gelegen haben. Nach Hammarsten⁵⁾ soll Rinderfibrin und nicht Schweinefibrin zur Verwendung kommen, wegen der relativ leichten Löslichkeit des letzteren schon in pepsinfreien Säurelösungen⁶⁾. Auch für rohes Rinderfibrin besteht diese Gefahr, und Hammarsten empfiehlt daher, dasselbe in gekochtem Zustand für die Verdauungsversuche zu benutzen und eine Kontrolle mit Säure allein anzusetzen.

¹⁾ Landerer, Ueber das Verhalten von Lab und Pepsin im Fundus und Pylorus, Tübingen 1908.

²⁾ Siehe im folgenden.

³⁾ Roaf, Biochem. Journ. 3 (1908) 188; Palladin, Archiv f. d. ges. Physiol. 134 (1910) 337.

⁴⁾ Sahli, loc. cit. 6. Aufl., Leipzig u. Wien 1913, S. 614.

⁵⁾ Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chem., Wiesbaden 1904, S. 301, 302.

⁶⁾ Fermi, Zeitschr. f. Biol. 28 (1891) 299.

Leo¹⁾ und Hoffmann²⁾ halten bei dieser Probe den Zusatz von Thymol zur Desinfektion für unerlässlich. Sahli³⁾ betont die Notwendigkeit eines Zusatzes desinfizierender Agenzien (Thymol, Chloroform, Ol. menth. pip., Ol. sinapis aethereum) wenigstens bei der Prüfung der Fäzes auf Pepsin und Trypsin (eventuell auch Diastase und Invertase, v. Jaksch, Leo). Die Fermente werden den desinfizierten Fäzes oder auch anderen Materialien durch Glycerin oder durch Fibrin bzw. nach Abderhalden⁴⁾ durch Elastin (vermöge der Bindung zwischen diesen Eiweißkörpern und den Verdauungsfermenten) entzogen und das Extrakt oder das fermentbeladene Eiweiß zum Verdauungsversuch verwendet, wobei im letzteren Fall die Spaltung an dem beladenen Fibrin oder Elastin selbst ausgeführt werden kann. Die Pepsinuntersuchung wird in 0,2%iger Salzsäure, die Prüfung auf Trypsin in 0,3—0,4%iger Sodalösung vorgenommen, wobei auch hier ein Zusatz von Desinfizienzien empfohlen wird. Immerhin darf nicht vergessen werden, daß nach Wedemeyer⁵⁾ Thymol wie auch Chloroform und Toluol eine deutliche, wenn auch nicht gerade starke verdauungshemmende Wirkung ausüben. Für den Nachweis von Proteasen der Darmschleimhaut hat Hamburger⁶⁾ deren Extraktion durch ein selbst nicht spaltbares, aber Enzyme adsorbierendes Substrat (Agar-Agar) empfohlen, das in kleinen, 3 ccm fassenden gläsernen Zylindern auf die Mukosa gebracht wird und nach der Beladung mit deren Enzymen und Versetzen mit 0,4% HCl oder 0,3% Na₂CO₃ zur Prüfung auf die betreffenden Proteasen dient.

An Stelle des Fibrins bedient man sich auch feiner Scheibchen von Eiereiweiß, die nach kürzerem oder längerem Aufenthalt in der proteasehaltigen Lösung Arrosionen aufweisen⁷⁾. Statt in dieser Form kann man das Eiweiß in kleinen Würfeln verwenden, welche nach dem Verweilen in der Fermentlösung Abrundung der Ecken zeigen. Endlich kann man die im folgenden besprochene quantitative Mettsche Methode (ursprünglich für Pepsin ausgearbeitet) natürlich auch für den qualitativen Nachweis benutzen, ein Verfahren, das durch Ersatz der Eiweißkapillaren durch Röhrchen, die mit Methylviolett gefärbter Gelatine beschickt sind, seinerseits der Abänderung fähig ist⁸⁾. An

¹⁾ Leo, Pflügers Archiv 39 (1886) 246 (siehe auch im folgenden).

²⁾ Hoffmann, Pflügers Archiv 41 (1887) 148.

³⁾ Sahli, Lehrb. d. klin. Untersuchungsmethod., 6. Aufl., 1913, Bd. I, S. 729.

⁴⁾ Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 74 (1911) 67, 411.

⁵⁾ Wedemeyer, Landwirtsch. Versuchsstat. 51 (1899) 375.

⁶⁾ Hamburger, Acad. van Wetenschappen Amsterdam 17 (1907) 191; Archive Néerl. [2] 13, 427.

⁷⁾ Man stellt sich die Scheibchen in der Weise her, daß man aus einem eben hartgekochten Ei mittels eines Korkbohrers einen Eiweißzylinder von ca. 5 mm Durchmesser heraussticht und den letzteren dann in millimeterdicke Scheibchen zerschneidet, die in Glycerin aufbewahrt werden (Sahli, loc. cit. Fußnote 3, diese Seite, S. 614).

⁸⁾ Linossier, Compt. rend. Soc. Biol. 52 (1900) 298 (für den Trypsinnachweis ausgearbeitet).

Stelle der Gelatineröhrchen hat Fermi¹⁾ Gelatine (3%)-Soda (1—7%)-Platten für den Trypsinnachweis vorgeschlagen und auf diesem Wege Trypsin noch in millionenfacher, Schouten²⁾ (durch eine geringfügige Modifikation) in noch größerer Verdünnung nachgewiesen. Der Gelatineplattenmethode bedienten sich ferner Hankin und Westbrook³⁾ und zwar in der Weise, daß sie auf die schwach geneigte Thymolgelatineplatte ein Tröpfchen der auf einen Proteasegehalt zu prüfenden Lösung bringen. Ist kein Ferment zugegen, so verändert das Tröpfchen seine Lage nicht. Die Gegenwart von Proteasespuren bedingt dagegen ein Heruntersickern des Tropfens⁴⁾. In einem von Müller und Jochmann⁵⁾ angegebenen Verfahren ist die Gelatineplatte ersetzt durch eine Platte von koaguliertem Serum. Man läßt hierbei ebenfalls einen Tropfen der enzymverdächtigen Flüssigkeit auf die Platte einwirken, wobei man, um den Zusatz von Antiseptizis überflüssig zu machen, den Vorgang durch Temperaturerhöhung auf 55—60° abkürzt. Eine kleine Einsenkung an der Stelle, wo der Tropfen mit dem Serum gestanden hatte, verrät die Gegenwart des Enzyms.

Auch zentrifugierte und durch feuchtes Papier filtrierte Milch ist zum Proteasenachweis von Bierry und Henri⁶⁾ empfohlen worden, denn solche Milch zeigt die Eigentümlichkeit, bei Zusatz geringer Mengen einer proteaschaltigen Flüssigkeit, durchscheinend zu werden. Durch dasselbe Verhalten zeichnet sich auch eine von Jacoby⁷⁾ empfohlene trübe Rizinlösung⁸⁾ aus, die schon in Gegenwart von 0,001 mg Pepsin sowie in 1%iger Sodalösung durch entsprechend geringe Trypsinmengen aufgehellt wird.

Etwas umständlicher als die soeben besprochenen Methoden sind jene, die sich auf den Nachweis der unter dem Einfluß der Protease

¹⁾ Fermi, Archiv f. Hygiene 40 (1906) 155.

²⁾ Schouten, Zentralbl. f. Bakt. [2] 18 (1907) 94.

³⁾ Hankin u. Westbrook, Ann. de l'Inst. Pasteur 6 (1892) 633.

⁴⁾ An Stelle der Thymolgelatine verwendet Kniakof, Med. Klinik (1911) 108, Formolgelatine mit Tuschezusatz. Bei der Nachbehandlung mit lauwarmem Wasser wird die Lösung an den Stellen, wo die Protease eingewirkt hat, vervollständigt, was Kantorowitz, Münchner med. Wochenschr. (1912) 2496, veranlaßt hat, das entstandene Loch auf Bromsilberpapier dauernd zu fixieren.

⁵⁾ Müller u. Jochmann, Münch. med. Wochenschr. (1906) 26; Müller, Archiv f. klin. Medizin 91 (1907) 291.

⁶⁾ Bierry u. Henri, Compt. rend. Soc. Biol. 54 (1902) 667; siehe ferner Mandelbaum, Münchner med. Wochenschr. (1909) 2215.

⁷⁾ Jacoby, Biochem. Zeitschr. 1 (1906) 53, 10 (1908) 229.

⁸⁾ Nach Jacobys Angaben besteht dieselbe aus 1 g Rizin und 1,5 g Kochsalz in 100 Wasser gelöst.

gebildeten Spaltprodukte gründen, und bei den vorzüglichen Leistungen der erstgenannten wird man daher diese letzteren meist erst dort anwenden, wo man mit dem Nachweis zugleich eine Entscheidung über die Natur der Protease oder deren Menge verbinden will.

Als Mittel zum Nachweis einer stattgefundenen Eiweißspaltung kann nach Sahli (loc. cit.), Leo (loc. cit.), Gehrig¹⁾, Palier²⁾ und Abderhalden³⁾ die Verfolgung der Biuretreaktion dienen, welche bei nativem Eiweiß violett, bei Peptonen rot ausfällt, während die Albumosen, je nachdem sie in ihrer Konstitution dem nativen Eiweiß oder den Peptonen näher stehen, eine mehr dem Violett oder mehr dem Rot sich nähernde Mischfarbe zeigen. So empfehlen Abderhalden und Strauch (loc. cit.) Elastin⁴⁾ in das zu prüfende Material einzulegen, auf diese Weise mit dem Ferment zu beladen, danach zu waschen und in $\frac{1}{10}$ -normaler Salzsäure der Wirkung des adsorbierten Pepsins zu überlassen, die sich durch das Verschwinden des Elastins, durch die Linksdrehung der Lösung, sowie durch die Biuretreaktion der letzteren verrät⁵⁾. Bevor die Biuretreaktion angestellt wird, welche sich je nach der Natur des verwendeten Proteins rascher oder langsamer entwickelt⁶⁾, muß man das native Eiweiß durch Koagulation eliminieren. Auch der Nachweis von Produkten einer völligen Aufspaltung des Eiweißkerns, wie vornehmlich des Tyrosins und des Tryptophans, kann natürlich für den Proteasenachweis herangezogen werden, doch wird dadurch zugleich die zweite der oben gestellten Fragen gelöst.

Die Differenzierung der Proteasen.

Die Entscheidung, was für eine Protease in einem bestimmten Fall vorliegt, ergibt sich aus ihrem Spaltungsvermögen gegenüber der Klasse der Proteine. Werden nach der Einwirkung einer zu prüfenden Fermentlösung auf genuines Eiweiß die Produkte einer vollständigen Spaltung aufgefunden, so handelt es sich um Trypsase, deren

¹⁾ Die erwähnten Forscher haben diese Methode zugleich empfohlen, um bei ihrer Fibrinmethode durch den Peptonnachweis Schlüsse auf die vorhandenen Pepsinmengen ziehen zu können.

²⁾ Palier, Wiener klin. Wochenschr. 21 (1908) 727.

³⁾ Abderhalden u. Strauch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71 (1911) 320.

⁴⁾ Elastin ist ein aus dem Ligamentum nuchae des Pferdes hergestellter Eiweißkörper.

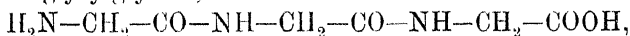
⁵⁾ Ueber die Biuretreaktion siehe den *Spez. Teil* dieses Werkes, 1. Abteil. im Abschnitt: Katalyse durch Hydroxylionen, sowie im folgenden im Kapitel über die Abwehrfermente.

⁶⁾ Siehe Vernon, Journ. Physiol. 30 (1904) 330.

Wirkung aber wahrscheinlich durch den hintereinandergeschalteten Effekt eines proteolytischen und eines die Polypeptidbindungen angreifenden peptischen Prinzips zustande kommt¹⁾. Bleibt der Abbau auf halbem Wege bei Albumosen oder Peptonen stehen, so kann nur eine Pepsinase vorliegen, deren Vorhandensein überdies durch Feststellung einer so starken Wasserstoffionenkonzentration²⁾ des Mediums, daß alle anderen Fermentwirkungen ausgeschaltet sind, mit Sicherheit erwiesen ist. Setzt die Spaltung erst bei den Produkten einer vorangegangenen Verdauung ein, so ist meist eine Peptase im Spiele; doch kann auch eine Tryptase in Frage kommen, wenn das zu spaltende Eiweiß sehr resistent ist. Eine Unterscheidung zwischen Tryptasen und Peptasen ist aber nicht nur durch die bei den letzteren überhaupt fehlende Spaltbarkeit von genuinem Eiweiß³⁾ möglich, sondern auch dadurch, daß trotz bestehender Differenzen zwischen Peptasen verschiedener Herkunft gegenüber ungleichartigen Substraten diese Fermente im allgemeinen zu einer restlosen Aufspaltung derjenigen Peptide, die sich von natürlich vorkommenden Aminosäuren ableiten, befähigt sind, während das Trypsin nur einen Teil derselben weiter abzubauen vermag⁴⁾. So ist es indifferent gegenüber Glyzylglyzin



und dem Diglyzylglyzin⁵⁾



¹⁾ Vgl. im folgenden S. 191.

²⁾ Siehe hierüber den Spez. Teil, 1. Abteil.: „Katalyse durch Wasserstoffionen“.

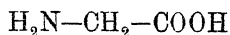
³⁾ Die Nichtangreifbarkeit von Fibrin durch pflanzliche Ereptase wurde durch Blood, Journ. Biol. Chem. 8 (1910) 215, erwiesen [vgl. ferner über pflanzliche Peptasen Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chem. 33 (1901) 59; Pfaundler, Zentralbl. f. Bakt. 31 (1902) 113; Dean, Bot. Gazette 40 (1905) 121; Delezennu. Mouton, Compt. rend. Soc. Biol. 55 (1903) 325; Javillier, Thèse Paris 1903; Abderhalden u. Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 49 (1906) 25; Abderhalden u. Dammhahn, Ebenda 57 (1908) 332; Abderhalden, Pincussohn u. Walther, Ebenda 68 (1910) 471; Reed u. Stahl, Journ. Biol. Chem. 10 (1911) 109; Sasaki, Biochem. Zeitschr. 41 (1912) 174, 47 (1912) 462, 472].

Für tierische Ereptasen wird eine bisweilen beobachtete schwache Spaltungsfähigkeit gegenüber Fibrin auf die Adsorption von Pepsinasen oder Tryptasen durch dieses Substrat zurückgeführt. Siehe hierüber Oppenheimer, loc. cit. 4. Aufl., Bd. 1, 1913, S. 374, 420 ff., daselbst auch ausführliche Literatur über Peptasen.

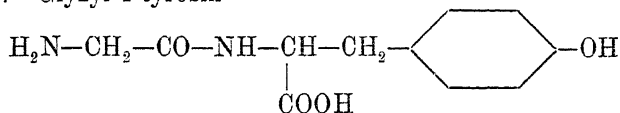
⁴⁾ Abderhalden u. Rona, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47 (1906) 359; Abderhalden u. Koelker, Ebenda 51 (1907) 294; siehe ferner die auf Abderhalden bezüglichen Literaturzitate im folgenden.

⁵⁾ Abderhalden u. Teruuchi, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47 (1906) 464, 49 (1906) 1; Abderhalden, London u. Vögtlin, Ebenda 53 (1907) 334.

welche unter dem Einfluß einer Peptase, z. B. des Leberfermentes, glatt in Glykokoll



zerfallen. Glyzyl-1-tyrosin



wird dagegen durch Tryptasen wie durch Peptasen zerlegt, und es kann diese Spaltung sowohl durch die Aenderung des optischen Drehungsvermögens, wie durch die Ausscheidung des Tyrosins festgestellt werden¹⁾. Demgegenüber geht den Pepsinasen nach dem Vorausgeschickten diese Fähigkeit ab, was eine scharfe Abgrenzung und Unterscheidung der letzteren von den beiden erstgenannten Enzymen ermöglicht²⁾, wenn man sich in irgendeinem konkreten Fall orientieren will, ob Pepsin oder Trypsin zugegen ist.

Schwieriger gestaltet sich die Untersuchung, wenn mehrere Proteasen von verschiedener Angriffsart gleichzeitig in dem auf seinen Enzymgehalt zu prüfenden Material vorliegen. In der Praxis sind aber gerade derartige komplizierte Fälle bei tierischen wie pflanzlichen Säften besonders häufig. Bei der Gewinnung von Darmsaft nach Boas³⁾ ist z. B. die Flüssigkeit infolge der Passage des Magens mit Pepsin verunreinigt, so daß dann normalerweise die drei verschiedenen Proteasen Pepsin, Trypsin und die Peptase Erepsin nebeneinander vorhanden sind und, abgesehen davon, daß sie wie das Trypsin durch Pepsin eine Zerstörung erleiden können, ihre Wirkungen übereinanderlagern. Nur durch sofortigen Zusatz von Sodalösung bis zur deutlich alkalischen Reaktion des Fermentgemisches läßt sich der aus doppeltem Grunde störende Einfluß des Pepsins ausschalten. Die verdauende Wirkung des so behandelten Darmsaftes gegenüber Eiweißkörpern würde dann in der Norm durch die gemeinsame Wirkung des Trypsins und des Erepsins zustande kommen⁴⁾. Um zu entscheiden, ob sich an dem Verdauungs-

¹⁾ Siehe im folgenden.

²⁾ E. Fischer u. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **46** (1905) 52; Abderhalden u. Brahm, Ebenda **57** (1908) 342.

³⁾ Boas, Zentralbl. f. klin. Medizin **10** (1889) 97; Zeitschr. f. klin. Medizin **17** (1890) 155.

⁴⁾ An älterer Literatur über die als Fermente wirkenden Bestandteile des Pankreas und die Pankreasverdauung siehe Béchamp, Compt. rend. **92** (1881) 142; Duclaux, Ebenda **94** (1882) 808; über Darmverdauung Derselbe, Ebenda **94** (1882) 877; über Magenverdauung Derselbe, Ebenda **94** (1882) 736; Béchamp, Ebenda **94** (1882) 532, 579, 970; Gautier, Ebenda **94** (1882) 652.

geschäft beide Fermente oder nur eines von beiden beteiligen, würde man einer Probe des Untersuchungsmaterials eine durch Magdalarot oder Kongorot gefärbte Fibrinflocke zusetzen. Bleibt die Lösung derselben aus oder wird sie nicht stärker angegriffen¹⁾ als eine gleich große Fibrinflocke in einer fermentfreien Kontrollösung von gleicher Alkaleszenz wie die auf ihren Trypsingehalt geprüfte, so enthält das Verdauungsgemisch wenig oder kein Trypsin. Die Gegenwart des Erepsins verrät sich dagegen, gleichviel ob Trypsin vorhanden ist oder nicht, wenn Glyzylglyzin oder Leuzylleuzin oder irgendein anderes aus natürlich vorkommenden Aminosäuren hervorgegangenes trypsinresistentes Polypeptid²⁾ einer Probe des zu prüfenden Darmsaftes zugegeben wird.

Auch gewöhnliche Albumosen und Peptone werden selbstverständlich in Gegenwart des Erepsins vollständig hydrolytisch aufgespalten, was durch das Verschwinden der Biuretreaktion festgestellt werden kann. Da aber die Möglichkeit vorliegt, daß in einem natürlichen Albumose-Pepton-Gemisch auch durch Trypsin vollständig aufspaltbare Polypeptide vorhanden sind, so würde durch die Verwendung solch gewöhnlicher Albumosen und Peptone die Abgrenzung vom Trypsin weniger sicher sein als bei der Benutzung synthetischer Polypeptide. Peptide, die von den in der Natur nicht vorkommenden stereoisomeren Aminosäuren derivieren, werden nicht gespalten, und in den racemischen Formen bleibt das von den letzteren abstammende Polypeptid bei der Einwirkung von Peptasen unangegriffen zurück³⁾. Dagegen sind nach den Untersuchungen von Abderhalden u. Rilliet⁴⁾, sowie Abderhalden u. Pringsheim⁵⁾ manche Pilzsäfte, außer einem Gehalt an echten Peptasen auch durch ein Prinzip ausgezeichnet, welches Polypeptide spaltet, die in der Natur nicht vorkommende Aminosäuren enthalten. Das Erepsin des Darmsaftes soll außer der Wirkung auf Albumosen, Peptone, Histone und Protamine (nach Lambert⁶⁾) auch einen schwachen Einfluß auf Eialbumin besitzen, während Oppenheimer⁷⁾ eine Nichtangreifbarkeit von Eialbumin durch alle Peptasen annimmt. Für das Kasein sind die Angaben ebenfalls widersprechend. Für eine Spaltung durch Erepsin sind außer Lambert, loc. cit., Döblin⁸⁾, Frank u. Schittenhelm⁹⁾ eingetreten; dagegen Werzberg¹⁰⁾, Brugsch u. Masuda¹¹⁾, sowie

¹⁾ Siehe im folgenden.

²⁾ Ueber hydrolysierbare und nicht hydrolysierbare Polypeptide siehe *Allg. Teil*, S. 512.

³⁾ Abderhalden u. Geddert, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 74 (1911) 394.

⁴⁾ Abderhalden u. Rilliet, *Ebenda* 55 (1908) 395.

⁵⁾ Abderhalden u. Pringsheim, *Ebenda* 59 (1909) 249, 65 (1910) 180.

⁶⁾ Lambert, *Compt. rend. Soc. Biol.* 55 (1903) 416.

⁷⁾ Oppenheimer, loc. cit. 4. Aufl., Bd. 1, 1913, S. 374.

⁸⁾ Döblin, *Deutsche med. Wochenschr.* (1909) 1095.

⁹⁾ Frank u. Schittenhelm, *Zeitschr. f. experim. Pathol.* 8 (1911) 237, 481.

¹⁰⁾ Werzberg, *Archiv f. Verdauungskrankh.* 17 (1911) 533.

¹¹⁾ Brugsch u. Masuda, *Zeitschr. f. experim. Pathol.* 8 (1911) 617.

Groß¹⁾, dessen Trypsinbestimmungsmethode, je nach der Entscheidung der Frage der Kaseinspaltung durch Erepsin auf die Trypsinermittlung in den Fäzes²⁾ angewendet werden darf oder nicht.

Es ist auch möglich, Erepsin und Trypsin dadurch voneinander zu trennen und getrennt weiter zu untersuchen, daß man das Untersuchungsmaterial mit Elastin³⁾ zusammenbringt, welches Erepsin fast gar nicht, Trypsin dagegen sehr stark adsorbiert. Vom Trypsinogen wird Erepsin durch Dialyse getrennt⁴⁾.

Das Gegenstück zu dem erwähnten Fall, in welchem Pepsin als störende Verunreinigung eines zu untersuchenden Darmsaftes in Frage kommt, liegt dann vor, wenn Darmsaft in den Magen zurücksteigt. Daß dies stattgefunden hat, läßt sich nach Abderhalden und Schittenhelm⁵⁾, an Hand der erlangten Spaltungsfähigkeit des Magensaftes gegenüber Glyzyl-l-Tyrosin feststellen. Doch könnte eine Polypeptid spaltende Fähigkeit, abgesehen von der Nahrung, z. B. roher Milch⁶⁾, auch durch verschluckten Speichel, welcher nach Koelker⁷⁾, Weinstein⁸⁾, Warfield⁹⁾, Jacque und Woodgatt¹⁰⁾ eine Glyzyl-l-tryptophan usw. spaltende Peptase enthält, auf den Magensaft übertragen werden. Hierdurch und durch die Ereptase zurückgestiegenen Darminhalts verliert ein von Neubauer und Fischer¹¹⁾ für die Diagnose von Karzinom herangezogener Peptasenachweis an

¹⁾ Groß, Deutsches Archiv f. klin. Med. 108 (1912) 106.

²⁾ Groß, Deutsche med. Wochenschr. (1909) 706; Koslowsky, Der Nachweis des Trypsins in den Fäzes, Dissert., Greifswald 1909.

³⁾ Abderhalden, loc. cit.; Amantea, Arch. di Farm. 12, 499, 562, 13, Heft 3 u. 4; Biochem. Zentralbl. 13 (1912) 1313, 1314, 14 (1912) 1056.

⁴⁾ Siehe über die Dialyse von Erepsin Koelker, Journ. Biol. Chem. 8 (1910) 145. Ueber die Trennung der Pankreasfermente durch ihr ungleiches Lösungsvermögen in Salzlösungen siehe Paschutin, Zentralbl. f. d. med. Wiss. 10 (1872) 97; Archiv f. Anat. Physiol. (1873) 382. Ueber die Differenzierung von Tryptasen und Peptasen bei Pflanzensäften auf Grund der leichteren Extrahierbarkeit der letzteren durch 2%ige Kochsalzlösung oder besser verdünnten Alkohol siehe Vines, Ann. Bot. 18 (1904) 289, 19 (1905) 149, 171, 20 (1906) 113, 22 (1908) 103, 23 (1909) 1, 24 (1910) 213.

⁵⁾ Abderhalden u. Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 59 (1909) 230.

⁶⁾ Ueber die Peptase in roher Milch siehe Wohlgemuth u. Streich, Berl. Akad. Ber. (1910) 520; Warfield, Journ. med. Research 25 (1911) 235.

⁷⁾ Koelker, Zeitschr. f. physiol. Chem. 76 (1911) 27.

⁸⁾ Weinstein, Journ. Amer. med. Assoc. 57 (1911) 1420.

⁹⁾ Warfield, Bull. Johns Hopkins Hosp. 22 (1911) 150.

¹⁰⁾ Jacque u. Woodgatt, Archive Int. Med. 10 (1912) 560.

¹¹⁾ Neubauer u. Fischer, Deutsches Archiv f. klin. Med. 97 (1909) 499.

Bedeutung, welcher sich auf die Spaltungsfähigkeit des Magensaftes Karzinomkranker gegenüber Glyzyl-l-tryptophan gründet¹⁾.

Tumorpeptase besitzt nach den Untersuchungen von Abderhalden²⁾ an Tumorsekretis nicht nur die Fähigkeit eines besonders raschen Angriffs gegenüber Polypeptiden, im Gegensatz zu der herabgesetzten peptischen Kraft der tumorbefallenen Gewebe³⁾, sondern dieselbe vermag in atypischer Weise einzugreifen und z. B. aus d-Alanyl-glyzyl-glyzin statt dem d-Alanin zunächst Alanyl-glyzin abzuspalten, ein Umstand, der vielleicht außer dem großen theoretischen Interesse, das ihm zukommt, in praktischer Hinsicht bedeutungsvoll ist.

Findet sich in einem natürlich vorkommenden oder in einem künstlich hergestellten Gemisch proteolytischer Fermente eine Pepsinase nicht als Verunreinigung, sondern als ordentlicher Bestandteil — eine Kombination, die allerdings wegen der schon erwähnten Zerstörbarkeit des Trypsins durch Pepsin und der ungleichen Wirkungsbedingungen beider Enzyme nur unter besonderen Umständen überhaupt realisiert sein kann —, so würde man die Prüfung auf die Pepsinase und auf die beiden anderen Proteasen an zwei getrennten Proben vornehmen. In der einen würde, wie oben beschrieben, die Wirkung des Pepsins durch Sodazusatz ausgeschaltet und auf Tryptase und Peptase, wie angegeben, geprüft. Die zweite Probe würde dagegen angesäuert und damit der Einfluß des Trypsins eliminiert. Das Verschwinden einer Fibrinflocke (event. mit Karmin gefärbt), der Ausfall der Biuretreaktion in der für Albumosen charakteristischen Färbung, nachdem das genuine Eiweiß durch Koagulation weggeschafft worden ist, und das Fehlen eines Spaltungsvermögens gegenüber Glyzyl-l-tyrosin oder irgend einem anderen Polypeptid beweist die Gegenwart einer Pepsinase.

Was die Frage betrifft, in welcher Weise die unter dem Einfluß von Tryptasen und Peptasen gebildeten kristallinischen Spaltprodukte nachgewiesen werden können, so kommen hierbei vornehmlich zwei Substanzen in Betracht, die sich durch typische Eigentümlichkeiten auszeichnen. Der eine Stoff ist das Tryptophan oder Proteinochromogen,

¹⁾ Siehe Oehrl u. Schittenhelm, Zentralbl. f. Physiol. u. Pathol. d. Stoffw. 5 (1910) 881; Kuttner u. Pulvermacher, Berliner klin. Wochenschr. 47 (1910) 2057. Doch sollen nach Hall u. Williamson, Journ. Pathol. Bakt. 15 (1911) 350, 352; Biochem. Zentralbl. 12, 2046, 2047, trotzdem unter bestimmten Bedingungen zuverlässige Resultate erhalten werden.

²⁾ Abderhalden, Zeitschr. f. Krebsforschung 9 (1910) 266; Abderhalden, Rona, Medigreceanu u. Pincussohn, Zeitschr. f. physiol. Chem. 60 (1909) 415, 62 (1909) 145, 66 (1910) 265, 276.

³⁾ Colwell and Mc Cormac, Arch. middlesex Hosp. 15 (1909) 96, 104.

dessen Konstitution Ellinger und Flamand¹⁾ als die eines l-Indolalanins erkannt haben. Dieser Körper gibt schon in geringen Mengen mit sehr verdünntem Bromwasser in essigsaurer Lösung oder auch in Gegenwart von etwas Schwefelsäure eine violette Färbung. Auch läßt sich das Tryptophan leicht mittels Merkurisulfat und Schwefelsäure²⁾ rein gewinnen³⁾. Es sind daher von Abderhalden⁴⁾ tryptophanhaltige Polypeptide, wie das Glyzyltryptophan⁵⁾, für den Nachweis von Tryptasen und Peptasen verwendet worden.

Das andere und frühzeitig⁶⁾ nachweisbare Spaltprodukt ist das Tyrosin, welches bei der tryptischen Hydrolyse von genuinem Eiweiß sowohl als beim Zerfall des Glyzyl-l-tyrosins und anderer den Tyrosinkern enthaltender Polypeptide unter dem Einfluß von Tryptasen und Peptasen entsteht. Das Tyrosin kann sowohl als solches erkannt werden, wie vermittels bestimmter chemischer Veränderungen, welche es zu erleiden vermag. Auf der Identifizierung in Substanz beruht die Methode von Arthus und Huber⁷⁾, nach welcher 2—3 Volumina einer Lösung von Fibrin in Fluornatrium⁸⁾ mit einem Volum der mit 2%iger Fluornatriumlösung auf das Doppelte verdünnten fermenthaltigen Flüssigkeit bei 40° digeriert werden. Es scheidet sich dann nach einiger Zeit das Tyrosin krustenförmig oder in charakteristischen mikroskopisch sichtbaren büschelförmigen Aggregaten feiner Kristallnadeln aus, die sich im Polarisationsmikroskop bei gekreuzten Nikol hell vom dunkeln Grunde abheben.

Auch bei der von Bergell und Schütze⁹⁾ vorgeschlagenen Methode mittels der 10%igen schwach alkalischen Lösung eines Peptons aus Seidenfriboin fällt das Tyrosin schon in Gegenwart sehr kleiner Tryptasequantitäten in Kristallen aus.

¹⁾ Ellinger u. Flamand, Ber. d. chem. Ges. 40 (1907) 3029.

²⁾ In 5%iger Lösung.

³⁾ Hopkins u. Cole, Journ. Physiol. 27 (1901) 418.

⁴⁾ Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 66 (1910) 137.

⁵⁾ Abderhalden empfiehlt die Verwendung einer 10%igen Lösung dieses Polypeptids.

⁶⁾ Abderhalden u. Reinbold, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44 (1905) 285. 46 (1905) 159; Brown u. Millar, Journ. Chem. Soc. London 89 (1906) 145.

⁷⁾ Arthus u. Huber, Arch. Physiol. (1894) 622.

⁸⁾ Frisches, durch Schlagen von Pferdeblut gewonnenes und bis zur Farblosigkeit ausgewaschenes Fibrin wird mit einer 2%igen Fluornatriumlösung ganz bedeckt und so bei 40° C während 24 Stunden belassen. Die danach filtrierte Lösung hält sich mehrere Monate.

⁹⁾ Bergell u. Schütze, Zeitschr. f. Hygiene 50 (1905) 305.

Schumm¹⁾ hat früher schon zu demselben Zweck eine 30%ige, schwach alkalische Lösung von Wittepepton benutzt und nach Eliminierung des nativen Eiweißes durch Koagulation das Filtrat auf Tyrosin geprüft.

Abderhalden und Schittenhelm²⁾ haben ebenfalls, insbesondere für den Peptasenachweis in tierischen und pflanzlichen Geweben, empfohlen, die zu prüfenden Schnitte — die, wenn tierische Organe zur Verwendung kommen, blutfrei sein müssen — in eine 25%ige Seidenpeptonlösung einzulegen und, mit Toluol überschichtet, im Brutschrank bis zum Auftreten der Tyrosinkristalle sich selbst zu überlassen.

Durch Abkühlen scheidet sich das Tyrosin vollständig aus und kann durch Wägung quantitativ bestimmt werden. Wo das Tyrosin nicht von selbst auskristallisiert, kann man dasselbe nach der von Huppert angegebenen Methode isolieren³⁾. Außerdem läßt sich die Spaltung polarimetrisch verfolgen⁴⁾.

Um Tyrosin chemisch nachzuweisen, bestehen verschiedene Möglichkeiten. Liegt dasselbe schon in Substanz vor, so kann die Piriasche Probe⁵⁾ angestellt werden, wobei das Tyrosin trocken mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure eine halbe Stunde im Wasserbad gekocht wird. Das Tyrosin geht dabei als Tyrosinschwefelsäure mit rötlicher Farbe in Lösung. Man gießt die Lösung in etwas Wasser, neutralisiert mit Bariumkarbonat, filtriert, dampft das Filtrat bis auf einige Kubikzentimeter ein und setzt nach dem Erkalten eine stark verdünnte säurefreie Eisenchloridlösung hinzu. Das Auftreten einer violetten Färbung zeigt das Vorhandensein von Tyrosin an. Ferner läßt sich das Tyrosin in seiner heißen wäßrigen Lösung nach R. Hoffmann⁶⁾ durch eine Dunkelrotfärbung und die Bildung eines massigen roten Niederschlags nach Zusatz von Merkurinitrat und Kaliumnitrit bzw. dem Reagens von Millon, nachweisen. Mit Hilfe des Reagens von Mörner⁷⁾, sowie demjenigen, welches Folin⁸⁾ angegeben hat⁹⁾, läßt

¹⁾ Schumm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 36 (1902) 292.

²⁾ Abderhalden u. Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 61 (1909) 421.

³⁾ Sahli, Lehrb. d. klin. Untersuchungsmethoden, Leipzig u. Wien 1905, S. 530.

⁴⁾ Abderhalden, Die Schutzfermente des tierischen Organismus, Berlin 1912, S. 45; Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 5, 575; Abderhalden u. Koelker, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51 (1907) 294.

⁵⁾ Siehe Sahli, loc. cit. vorletzte Fußnote.

⁶⁾ Zitiert nach Sahli, loc. cit. vorige Fußnote, S. 530.

⁷⁾ Siehe Court, Proc. Royal Soc. Edinburgh 31 (1911) 342.

⁸⁾ Folin, Journ. Biol. Chem. 12 (1912) 239.

⁹⁾ 100 g Natriumwolframat, 20 g Phosphormolybdänsäure und 5 g Phosphorsäure werden in Wasser gelöst und auf 1 Liter aufgefüllt. Die Lösung zeigt Tyrosin durch intensive Blaufärbung an.

sich eine geringe peptolytische Spaltung auf Grund der Tyrosinbildung kolorimetrisch ermitteln.

Auch die Eigentümlichkeit des Tyrosins, durch Tyrosinase in braungefärbte Produkte umgewandelt zu werden, ist von Harlay¹⁾ für den Tyrosinnachweis und damit also zur Unterscheidung von Pepsin und Trypsin herangezogen worden, wobei jedoch eine nicht zu unterschätzende Fehlerquelle in dem Umstand gegeben ist, daß auch den Tyrosinrest enthaltende Polypeptide in ähnlicher Weise reagieren können. Endlich haben sich Brown und Millar²⁾ des Brombindungsvermögens des Tyrosins bedient, eine Fähigkeit, die zur Bestimmung des Tyrosins herangezogen werden kann. Nach Brown und Millar wird in der tyrosin- und bromkaliumhaltigen Flüssigkeit eine titrierte Natriumbromatlösung zersetzt. Das frei gewordene Brom wird dann vom Tyrosin gebunden, so daß erst nach dessen Absättigung als Indikator zugesetzte Jodstärke eine Entfärbung erleidet.

Diesen Methoden, die auf den Nachweis einer bestimmten Aminosäure abstellen, ist ein Verfahren anzureihen, das Chodat³⁾ zur Orientierung über den Grad des Eiweißabbaus angegeben hat. Als Reagens dient ihm das Gemisch von p-Kresol und Tyrosinase⁴⁾, das für sich allein gelborange gefärbt einen Farbumschlag in Rot und danach in Tiefblau mit ausgesprochenem Dichroismus zeigt, sobald Glykokoll, Phenylaminopropionsäure, Leuzin oder Valin zugegen sind, während d-Alanin und Prolin sowie Albumosen nur unter bleibender Rotfärbung reagieren. Endlich stellen nicht auf die Qualität der Aminosäuren, sondern auf deren mit der Spaltung zunehmende Quantität ab die Methoden von Sörensen, van Slyke und Kober, worüber im folgenden Abschnitt berichtet ist.

Die quantitative Bestimmung der Proteasen.

Dieselbe gründet sich auf die nämlichen Prinzipien, welche die Auffindung der Protease ermöglichen. Auch hier wird man also zwischen Methoden, welche auf irgendeinem Wege den unter dem Einfluß einer Protease stattfindenden Verlust an Ausgangsmaterial direkt oder indirekt messend verfolgen, und jenen Verfahren zu unterscheiden haben, die den Zuwachs an Umsetzungsprodukten bestimmen.

¹⁾ Harlay, De l'application de la tyrosinase, Thèse Paris 1900.

²⁾ Brown u. Millar, loc. cit.

³⁾ Chodat, Archive des sciences phys. et nat. [4] 32 (1912) 70, 225.

⁴⁾ Hergestellt aus Kartoffelschalen.

1. Methoden, die sich der Auflösung erstarrten Blutserums bedienen.

Hierher gehört das einfache Verfahren der Dellenbildung, welches Müller und Jochmann¹⁾, wie zu ihrem schon besprochenen qualitativen Nachweis der Proteasen, auch zu deren quantitativer Bestimmung verwenden, indem sie mittels der Platinöse 6–8 Tropfen der unverdünnten Fermentlösung auf verschiedene Stellen einer ersten Löfflerplatte auftragen und in derselben Weise eine zweite Löfflerplatte mit einer mit Wasser zur Hälfte verdünnten Fermentlösung, eine dritte Platte mit der auf das Vierfache verdünnten Fermentlösung usw. beschicken. Nach 24stündigem Aufenthalt der Platten im Brutschrank bei 53° wird geprüft, bis zu welcher Verdünnung der Fermentlösung noch Dellenbildung auf der Platte zu konstatieren ist.

2. Methoden, die sich der Fibrinlösung bedienen.

a) Die Pepsinbestimmungsmethode von Grützner. Unter den Methoden dieser Art verbindet diejenige von Grützner²⁾ in prinzipieller und praktischer Hinsicht die Vorteile großer Empfindlichkeit, Einfachheit, rascher Ausführbarkeit und Genauigkeit³⁾, doch muß ein längeres Stehen der Vergleichslösungen wegen der hierdurch bedingten Farbänderungen vermieden werden.

Grützner war von dem Gedanken geleitet, daß bei der Verdauung von (mittels der Fleischhackmaschine) fein zerteiltem und

¹⁾ Müller u. Jochmann, Münchner med. Wochenschr. (1906) Nr. 29.

²⁾ Grützner, Ueber eine neue Methode, Pepsinmengen kolorimetrisch zu bestimmen, Pflügers Archiv 8 (1874) 452, 106 (1905) 463, 144 (1912) 545, und Habilitationsschrift, Breslau 1875; Arch. di Fisiol. 7 (1909) 223 (Festschr. f. Fano).

³⁾ A. Korn, Ueber Methoden, Pepsin quantitativ zu bestimmen, Dissert., Tübingen 1902/03, kam bei seinen vergleichenden Versuchen mit dieser Methode und derjenigen von Grünhagen, Pflügers Archiv 5 (1872) 203, und Mett zu sehr günstigen Resultaten in bezug auf die Brauchbarkeit der Methode. Bei richtiger Ausführung des Grütznerschen Verfahrens wird man sich jedenfalls nicht dem früheren Urteil Oppenheimers, Die Fermente, loc. cit 3. Aufl., Spez. Teil, S. 128, anschließen können, welches lautet: „Als irgendwie quantitativ kann man diese Methode indessen selbst im Rahmen dieser Verfahren nicht bezeichnen.“ Da Oppenheimer von einer Zählung der gefärbten Tropfen spricht, so ist hier offenbar eine Verwechslung unterlaufen, die im übrigen in der 4. Aufl. eliminiert worden ist. Die Brauchbarkeit der Methode ergibt sich aus Versuchen von Woiwodoff, Ueber die Methoden der Pepsinbestimmung und das Fermentgesetz, Inaug.-Dissert., Berlin 1907.

hierauf gefärbtem Fibrin¹⁾ der an dieses gebundene Farbstoff in dem Maß in Freiheit gesetzt werden muß, als die Aufspaltung des Fibrins voranschreitet. Die Intensität der Färbung, verglichen mit einer Farbenskala, hergestellt aus verschiedenen Verdünnungen des verwandten Farbstoffs²⁾, würde dementsprechend ein Maß abgeben für die relative verdauende Kraft einer Fermentlösung und damit bis zu einem gewissen Grad auch der relativen Fermentmenge³⁾. Was die Gewinnung gleichsam absoluter Werte für die vorhandenen Fermentquanta nach der Grütznerschen Methode betrifft, so kann man solche nur für das kleine Intervall bis 5 Minuten Verdauungszeit erwarten, innerhalb dessen das gleich zu besprechende Schützschke Gesetz, das mit Bestimmtheit für das erste Drittel der Verdauung angenommen werden kann⁴⁾, Gültigkeit besitzt, da dieses natürlich nur in solchen Fällen der Berechnung zugrunde gelegt werden darf.

Es gelten hier wohl dieselben Bedenken hinsichtlich eines Parallelgehens von Fermentmenge und verdauender Kraft, wie dies bei der Mettschen Methode (siehe im folgenden) näher ausgeführt ist, obgleich die Verhältnisse aus verschiedenen Gründen, so z. B. auch wegen der großen Oberflächenentwicklung des gequollenen Fibrins, hier sicherlich günstiger liegen als bei den Versuchsbedingungen des Mettschen Verfahrens. Zunächst besteht für die Einwirkung von Ferment auf jedes feste Substrat die von Grützner (Festschr. f. Fano), loc. cit. S. 242, betonte, mit der Fermentbindung zusammenhängende Komplikation, daß die faktisch wirksamen Fermentmengen den dritten Wurzeln der Quadrate der überhaupt vorhandenen Fermentquantitäten gleich sind, wenn die Lösung als kubisch, die Substratoberfläche als quadratisch vorausgesetzt wird.

Von Grützner ist die Methode ursprünglich speziell für die Pepsinuntersuchung ausgearbeitet worden, weshalb er als Färbemittel für das Fibrin⁵⁾ eine 14/oige ammoniakalische Karminlösung⁶⁾ und

¹⁾ Siehe im vorigen die entsprechende qualitative Nachweismethode für Proteasen.

²⁾ Die Farbenskala wird in der Weise hergestellt, daß man das erste der zehn Reagenzgläser, welche von gleicher Weite sind wie die bei dem Versuche selbst genommenen, mit 0,1 ccm einer 1/oigen Karminglyzerinlösung und 19,9 ccm Wasser beschickt. In jedem folgenden Reagenzglas wird sukzessive 0,1 ccm Wasser durch 0,1 ccm der Karminlösung ersetzt.

³⁾ Eine den Farbenton 6 der Skala erzeugende Fermentlösung würde 6mal soviel Fibrin aufgelöst haben als eine solche, die den Farbenton 1 erzeugt.

⁴⁾ Siehe Euler, Allg. Chem. d. Enzyme, Wiesbaden 1910. S. 95.

⁵⁾ Das bis zur Dunkelrotfärbung in der Farbstofflösung belassene Fibrin wird nach dem sorgfältigen Auswaschen mit Wasser und etwas Essigsäure enthaltendem Wasser unter Glycerin aufbewahrt, vor dem Gebrauch nochmals sorgfältig mit Wasser gewaschen, mit der 5—6fachen Quantität 0,1/oiger Salzsäure übergossen und während des Quellens mit der Schere in feine Stückchen zerschnitten. Von der resultierenden karmoisinroten, geleeartigen, aus kleinen,

für die Farbenskala ebenfalls eine Glycerinkarmminlösung¹⁾ verwendet. Doch wurde eine Uebertragung des Verfahrens auf die Bestimmung der Tryptasen, unter den bei dem entsprechenden Proteasenachweis angegebenen Modifikationen von Waldschmidt²⁾ durchgeführt, indem er mit Spritblau gefärbtes Fibrin verwendet³⁾, welches in gleichen Mengen⁴⁾ in eine Anzahl gleichkalibrierte Reagenzgläser gebracht wird, die je 10 cem 0,1%ige Sodalösung enthalten. Danach werden die verschiedenen Gläschen mit abgestuften Trypsinmengen beschickt und der Verdauungsgrad an Hand der Färbungsintensität der Flüssigkeit in einem Keilkolorimeter bestimmt. Das Spritblau wurde von Waldschmidt auch für die Pepsinbestimmung empfohlen ohne weitere Modifikation, als daß überall die 0,1%ige Sodalösung durch 0,1%ige Salzsäurelösung ersetzt wird.

Auch Vernon⁵⁾ bedient sich zur Trypsinbestimmung feingehackten Fibrins, das in 50%igem Glycerin aufbewahrt und vor dem Gebrauch 2 Stunden zum Quellen gebracht wird. Die Aufschwemmung wird bis zur Volumkonstanz des Bodensatzes vor und nach der Verdauung zentrifugiert und der Fermentgehalt nach der Höhendifferenz abgeschätzt.

b) Die Pepsinbestimmungsmethode von Grünhagen. Das Verfahren von Grünhagen⁶⁾, welches zwar besonders bei ungenauer Arbeitsweise einige ihm eigentümliche Fehlerquellen⁷⁾ einschließt, vermeidet dafür eine schwerwiegende Fehlerquelle der anderen Methoden⁸⁾. Nach diesem Verfahren werden gleiche Volumina von

gleichmäßigen Fibrinflöckchen bestehenden Masse werden für den Versuch gleich große Häufchen vom Höchstgewicht 1 g in Reagenzgläsern von gleicher Weite mit je 15 cem 0,1%iger Salzsäure übergossen und die Pepsinlösungen hinzugefügt (Korn, loc. cit. Fußnote 3, vorletzte Seite, S. 13 u. 14).

⁶⁾ Dieselbe soll möglichst wenig überschüssiges Ammoniak enthalten.

¹⁾ Vgl. Fußnote 3, vorige Seite.

²⁾ Waldschmidt, Archiv f. d. ges. Physiol. 143 (1911) 189.

³⁾ Zur Färbung wird das Fibrin in die Farbstofflösung eingelegt, die 0,5 g Spritblau-bläulich von Bayer u. Co. in 1 Liter Glycerin enthält. Nach gründlichem Auswaschen des gefärbten Fibrins mit Wasser kommt dasselbe in eine 0,1%ige Sodalösung, wird nach einigem Verweilen in derselben auf einer Glasplatte fein zerschnitten und mit Sodalösung abgespült.

⁴⁾ In den mit Sodalösung beschickten Gläschen sollen die Fibrinflocken ein Depot von ungefähr 1 cm Höhe ausmachen.

⁵⁾ Vernon, Journ. Physiol. 26 (1902) 405.

⁶⁾ Grünhagen, Pflügers Archiv 5 (1872) 203.

⁷⁾ Siehe im folgenden.

⁸⁾ v. Wittich, Pflügers Archiv 5 (1872) 135, und Korn, loc. cit. S. 176. Fußnote 3, S. 27, sprechen sich ungünstig über die Methode aus.

gewaschenem, in 0,2%iger Salzsäure zum Quellen gebrachtem Fibrin¹⁾ auf gleiche in gleichen Glastrichtern steckende Filter²⁾ gebracht und mit denselben geringen Volumina³⁾ der miteinander zu vergleichenden Pepsinlösungen gleichzeitig und gleichmäßig übergossen. Durch deren Einwirkung geht ein größerer oder geringerer Teil des Fibrins in gleichen Zeiten in Lösung und erlangt damit die Fähigkeit, durch das Filter zu gehen. Das Volumen des Filtrats abzüglich des bei der Kontrolle mit der Verdünnungsflüssigkeit allein an Stelle der Pepsinlösung eventuell durch das Filter gegangenen Flüssigkeitsquantums wird von 5 zu 5 Minuten abgelesen und bildet ein Maß für die während einer bestimmten Zeit umgesetzte Fibrinmenge und damit zugleich für die verdauende Kraft der betreffenden Pepsinlösung. Man kann auch diese Methode empfindlicher gestalten, indem man sie mit derjenigen von Grützner kombiniert und gefärbtes Fibrin verwendet. Nicht allein das Volumen des Filtrats, sondern auch die Intensität seiner Färbung bilden dann ein Maß für die Pepsinquantität.

Als Fehlerquellen dieses Verfahrens sind nicht nur die kaum völlig zu vermeidenden Ungleichheiten in der Konsistenz und der Oberflächenbeschaffenheit des auf die Filter gebrachten Fibrins anzusehen, sondern vor allem auch der prinzipielle Mangel, daß das auf dem Filter befindliche Gemisch mehr und mehr an Pepsin verarmt, da ein Teil des Fermentes mit den Spaltprodukten in das Filtrat wandert. Zudem könnte der Zusammenhang zwischen dem Volumen des Filtrats und der gelösten Fibrinmenge komplizierterer Natur sein, als dies Grünhagen angenommen hat. Dagegen besitzt die Methode, wie mir scheint, vor allen anderen in vitro ohne Kombination mit einem Dialysierverfahren ausgeführten Methoden den großen Vorteil, daß sie die das Fortschreiten des Prozesses in so auffallender Weise hemmenden

¹⁾ Das Fibrin muß sowohl vor wie nach der Quellung gut zerkleinert werden. Auch soll man dasselbe erst nachdem es durch die Salzsäurebehandlung teigige Konsistenz erlangt hat, auf die Filter bringen, in denen es gleichmäßig und gleich fest verteilt werden muß (siehe Korn, Inaug.-Dissert., Tübingen 1902, S. 28).

²⁾ Es empfiehlt sich nach Korn (loc. cit. vorige Fußnote), die Filter an der Spitze mit einer feinen Nadel durchzustechen, um einer Verkleisterung durch die gebildeten Peptone, welche den Abfluß hemmen, vorzubeugen.

³⁾ Korn verwendete bei einer Versuchsserie z. B. 0,1 ccm Pepsinlösung + 1,5 ccm 0,1%iger Salzsäure; 0,4 ccm Pepsinlösung + 1,2 ccm 0,1%iger Salzsäure; 0,9 ccm Pepsinlösung + 0,7 ccm 0,1%iger Salzsäure; 1,6 ccm Pepsinlösung + 0 ccm 0,1%iger Salzsäure und 0 ccm Pepsinlösung + 1,6 ccm 0,1%iger Salzsäure, so daß das Volumen immer 1,6 ccm betrug.

und die Gesetzmäßigkeiten dementsprechend störenden Verdauungsprodukte aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt. Die künstlichen Verdauungsbedingungen kommen dadurch in dieser Hinsicht den physiologischen Verhältnissen der Magenverdauung am nächsten, da bei dieser die Spaltprodukte ebenfalls durch Resorption und Abfluß nach dem Darm eliminiert werden. Um der Methode diesen Vorteil zu erhalten und gleichzeitig die Pepsinverluste im Reaktionsgemisch zu vermeiden, müßte man an Stelle der Filter Dialysatoren aus tierischen Membranen oder aus Pergament verwenden, die für die Produkte der Eiweißverdauung sowie für Wasser durchlässig, für das Ferment dagegen undurchlässig sind. Eine derartige dialytische Modifikation des Verfahrens dürfte insbesondere bei der natürlich im alkalischen Medium vorzunehmenden tryptischen Verdauung voraussichtlich auf keine großen Schwierigkeiten stoßen, da die dialysierbaren kristallinen Eiweißspaltprodukte ja ohne weiteres vom Trypsin durch eine semipermeable Membran zu scheiden sind.

c) Andere Fibrinauflösungsmethoden. Ungefärbtes Fibrin ist wenigstens zur Abschätzung des tryptischen Wirkungswertes von Pankreatin herangezogen worden, da die französische Pharmakopöekommission¹⁾ in Ergänzung der bei den im Abschnitt über die Diastase angegebenen Bestimmungen an ein gutes Pankreatin die Anforderung stellt, daß 0,2 g des Präparates, in 25 ccm Wasser gelöst, 5 g Fibrin bei 50° innerhalb 6 Stunden so weitgehend umgesetzt haben, daß bei Zusatz von Salpetersäure zum Filtrat eine Trübung kaum mehr wahrzunehmen ist.

Auf der bloßen Verflüssigung des Fibrins basieren auch für das Pepsin zwei Methoden, die seine quantitative Bestimmung gestatten. Die ältere davon stammt von Brücke²⁾ und läuft darauf hinaus, die Verdünnungen von miteinander zu vergleichenden Pepsinlösungen aufzusuchen, welche eine Fibrinflocke in derselben Zeit aufzulösen vermögen. Die Methode ist mit den besten modernen Pepsinbestimmungsmethoden konkurrenzfähig.

Die beiden Pepsinlösungen, welche man miteinander vergleichen will, werden vorerst auf eine Azidität von 0,1% Salzsäure gebracht und dann von beiden Lösungen eine Anzahl Verdünnungen mit 0,1%iger Salzsäure hergestellt. In gleiche Volumina sämtlicher Verdünnungen wird nun je eine Fibrinflocke ein-

¹⁾ Pharm.-Ztg. 27 (1882) 706; New Remedies 11, 193; zitiert nach Zeitschrift f. anal. Chem. 22 (1883) 294.

²⁾ Brücke, Sitzungsber. d. kaiserl. Akad. d. Wiss. zu Wien 37 (1859) 131; siehe ferner Brückes Lehrb. d. Physiol. 1 (1874) 296.

gelegt und festgestellt, in welchen Verdünnungen der einen und der anderen Reihe die Auflösung gleichzeitig vollendet ist. Das Verhältnis, in welchem diese Verdünnungen zueinander stehen, gibt an, um wievielfach der Fermentgehalt der einen der untersuchten Pepsinlösungen größer ist als derjenige der anderen.

Im Anschluß an die erwähnten Methoden sei auch derjenigen von Macquaire¹⁾ gedacht. Derselbe bedient sich ebenfalls des Auflösungsvermögens gegenüber Fibrin zur Bestimmung des Pepsins, doch betont er die Notwendigkeit, das Fibrin vor der Verwendung bei 40° im Luftstrom oder im d'Arsonvalschen Apparat zu trocknen²⁾, da der verschiedene Wassergehalt des Fibrins eine ungleiche Verdaulichkeit bedingt.

3. Methoden, die sich der Lösung von Eiereiweiß bedienen.

Die Verwendung von Eiereiweiß statt Fibrin besitzt den Vorteil, daß das erstere zu den gewöhnlichen Eiweißkörpern der Nahrung gehört und folglich ein Substrat darstellt, an welches sich das Pepsin angepaßt hat. Beim Fibrin handelt es sich dagegen um einen Eiweißkörper, mit dessen Verarbeitung sich der Magensaft normalerweise nicht befaßt. Salkowski³⁾ hält es daher nicht für einwandfrei, aus Fibrinversuchen auf die verdauende Kraft eines Magensaftes zu schließen. Auch Setschenow⁴⁾ hat die Verwendung des gegen Trypsin weniger widerstandsfähigen Eiereiweißes an Stelle des Fibrins schon für den qualitativen Nachweis empfohlen. Er läßt das Eiweiß bei 35–40° im Vakuum koagulieren.

a) Verfahren, bei denen die Eiweißoberfläche im Verlauf der Verdauung abnimmt. Artur Mayer⁵⁾ hat das Eiereiweiß in Form von Eiweißfäden⁶⁾ benutzt, die in gleich lange Stücke zerschnitten werden, und stellt wie bei der Methode von Brücke die Zeiten fest, welche die miteinander zu vergleichenden pepsinhaltigen Flüssigkeiten für die Auflösung gleicher Eiweißstücke benötigen.

Wie die bisher besprochenen Methoden gibt auch diejenige von A. Mayer einen Einblick in den Gang der Verdauung. Dies ist ferner der Fall bei der von v. Grützner⁷⁾ angegebenen Modifikation

¹⁾ Macquaire, Journ. Pharm. Chim. [6] 12 (1900) 67, 16 (1902) 289.

²⁾ Aus 100 g frischem Fibrin erhält man nach dem Trocknen ungefähr 25 g. Für den Verdauungsversuch werden 2,5 g des trockenen Präparates mit 60 cm 1^o/oiger Salzsäure und 0,2 g Pepsin 6 Stunden bei 50° digeriert und hierauf die Quantität des ungelösten Fibrins bestimmt.

³⁾ Siehe Groner, Virchows Archiv 150 (1897) 260.

⁴⁾ Setschenow, Zentralbl. f. d. med. Wiss. (1887) Nr. 27; zitiert nach Zeitschr. f. anal. Chem. 27 (1888) 123.

⁵⁾ A. Mayer, Zeitschr. f. Biol. 17 (1881) 351.

⁶⁾ Dieselben werden durch Gerinnenlassen und nachheriges Herausziehen von Hühnereiweiß aus kapillaren Glasröhren gewonnen.

⁷⁾ Siehe Korn, loc. cit. S. 179, Fußnote 1, S. 22.

der Methode von Bidder und Schmidt¹⁾, welche darauf hinausläuft, die Volumabnahme gleicher Eiweißzylinder²⁾ unter dem Einfluß der Pepsinlösungen messend zu verfolgen, indem von 2 zu 2 Stunden das Volumen durch Einbringen der Eiweißstücke in Meßgläschen von geeigneter Weite und Bestimmung der verdrängten Wassermenge festgestellt wird. Dagegen läßt die umständliche ursprüngliche Form des Verfahrens von Bidder und Schmidt — der ältesten Tryptasebestimmungsmethode, welche Anspruch auf die Bezeichnung quantitativ erheben kann — sowie deren Modifikation von Ebstein und Grützner³⁾ nur eine Feststellung der Eiweißquantität zu Anfang und zu Ende des Verdauungsversuches zu. Der Eiweißverlust wird nämlich hier bestimmt durch Subtraktion des Gewichts der Trockenrückstände⁴⁾ eines Eiweißzylinders vor der Verdauung und eines ursprünglich gleich schweren, der 18—20 Stunden bei 40° der Einwirkung des 4—6fachen Gewichts des zu untersuchenden Magensaftes unterworfen worden ist.

Auf die Messung der Zeit, die bis zur Erzielung einer bestimmten fermentativen Wirkung verstreicht, stellt die Methode von Illoyay⁵⁾ ab. Derselbe legt ein 0,1 g schweres Eiweißstückchen in 100 cem Magensaft ein. Ist der Magensaft normal, so soll die Auflösung 5—5½ Stunden in Anspruch nehmen, eine Angabe, die natürlich ohne die genaueste Festlegung der Beschaffenheit des verwendeten Eiweiß (vgl. hierüber die Angaben bei der Methode von Mett) zu sehr unsicheren Resultaten führen muß.

Sämtliche der bisher besprochenen Methoden, sowie auch diejenige von Schiff⁶⁾, welcher die verdauten Eiweißmengen nach vollendeter Verdauung bestimmt⁷⁾, zeigen die Eigentümlichkeit, daß die Oberfläche des festen Eiweißkörpers in dem Maß eine Verkleinerung erfährt, je weiter die Verdauung fortschreitet.

b) Verfahren, bei denen die Eiweißoberfläche im Verlauf der Verdauung konstant gehalten wird (Methode von

¹⁾ Bidder u. Schmidt. Die Verdauungssäfte und der Stoffwechsel, Mitau u. Leipzig 1852.

²⁾ Zum Unterschied von der vorigen Methode werden hier nur die Herstellung der Eiweißzylinder 5 mm weite Glasröhren benutzt.

³⁾ Ebstein u. Grützner, Pflügers Archiv 6 (1872) 1.

⁴⁾ Die Trocknung erfolgt bei 120° C.

⁵⁾ Illoyay, Archiv f. Verdauungskrankh. 11 (1905) 144; Amer. Journ. med. Soc. 138 (1909) 231.

⁶⁾ Schiff, Leçons sur la digestion 2 (1867), Leçon 27.

⁷⁾ D. h. nachdem die völlige Lösung von gehacktem Eiereiweiß unter dem Einfluß von Magenschleimhautextrakten stattgefunden hat.

Mett). Die fortgesetzte Oberflächenverkleinerung des Substrates hat Mett¹⁾ in der Weise ausgeschaltet, daß er die Eiweißzylinder in den Glasröhren, die bei der Herstellung solcher Zylinder Verwendung finden, beläßt²⁾ und sie in dieser Form dem Verdauungsgemisch bei 37° aussetzt. Das Pepsin wirkt dann vom Beginn bis zum Ende des Versuchs wenigstens nach der ursprünglichen Mettschen Ausführungsweise nur auf die freien Eiweißoberflächen an den beiden Enden eines Röhrchens und damit also auf eine konstant bleibende Substratmenge ein.

Der Vorteil einer Konstanz der der Pepsinwirkung ausgesetzten Oberflächen wird aber bei der Mettschen Methode durch eine Anzahl ihr eigentümlicher, schwerwiegender Fehlerquellen wieder illusorisch gemacht. Vor allem fällt ins Gewicht, daß bei keiner anderen Methode die Störung von seiten der Verdauungsprodukte einen solchen Grad erreicht wie hier. Schon Schiff³⁾ hatte festgestellt, daß die Verdauung eine viel langsamere ist, wenn man das Reaktionsgemisch ruhig sich selbst überläßt und damit den Eiweißstückchen Gelegenheit gibt, sich gleichsam mit einer Schutzhülle seiner die Wirkung des Pepsins hemmenden (oder gar zum Wiederaufbau [Plasteinbildung] zwingenden) Spaltprodukte zu überziehen, als wenn man für lebhaftere Durchmischung sorgt⁴⁾. Es ist daher einleuchtend, daß bei den Versuchsbedingungen der Mettschen Methode der Stoffaustausch infolge des kapillaren Zugangs zum Substrat ein besonders mangelhafter sein muß, der um so prekärer wird, je weiter im Verlauf der Verdauung

¹⁾ Mett, Contribution de l'innervation de la glande sous-tomacale, Petersburg 1889; du Bois Reymonds Archiv f. Physiol. (1894) 68.

²⁾ Die Herstellung der Eiweißröhrchen erfolgte nach der vor den durch Johanne Christiansen (siehe im folgenden) eingeführten Modifikationen meist gebräuchlichen Weise, so daß man in 1—2 mm weite und 20—30 cm lange Glas-kapillaren (Impfröhrchen) das Gemisch mehrerer Hühnereiweiße (um ein Eiweiß von möglichst gleichartiger Durchschnittsbeschaffenheit zu erhalten) einsaugte, die Enden mit Brot oder Wattepfropfen verschloß und die Röhrchen 5 Minuten lang in einem Wasserbad von 95° beließ. Da die Röhrchen erst nach 3 Tagen gebrauchsfertig sind, so werden hierauf die Enden in geschmolzenes Paraffin getaucht oder in 2%ige HCl gebracht (Korn, loc. cit. S. 33), um das Eintrocknen zu verhindern. Vor dem Gebrauch werden sie in 2 cm lange (nach Samojloff in 10—12 mm lange) Stücke zerschnitten und je zwei davon in einen Magensaft gelegt, da das Mittel von vier Verdauungslängen von Zufälligkeiten unabhängiger ist als das von zwei.

³⁾ Schiff, loc. cit. Fußnote 6, vorige Seite.

⁴⁾ Schiff trug deshalb die Fläschchen mit den Verdauungsgemischen beständig auf dem bloßen Körper mit sich herum.

die Endflächen des Eiweißzylinders von den Öffnungen nach der Mitte des Röhrchens rücken. Daher auch der Befund von Nierenstein und Schiff¹⁾, daß die Beobachtungen, wenn sie über eine Verdauungslänge von 3,6 mm hinaus fortgesetzt werden, wegen der ausgesprochenen Verlangsamung des Vorgangs zu falschen Resultaten führen. Die durch die schlecht diffusibeln Verdauungsprodukte bedingte Störung wird um so auffallender sein, je rascher die Verdauung voranschreitet, je stärker also der einwirkende Magensaft ist; denn der mangelhafte Stoffaustausch ist um so stärker fühlbar, d. h. der Ausgleich wird um so schlechter, je kürzer die Zeiten sind, die ihm zur Verfügung stehen. Auch die Lage der Röhrchen in der Pepsinlösung kommt für den Stoffaustausch in Betracht, denn, wie Korn²⁾ an mit Karmin gefärbtem Eiweiß gezeigt hat, ist bei senkrechter Stellung die obere Verdauungslänge viel geringer als die untere, bei welcher der Abfluß der hemmenden Produkte freier erfolgen kann. Bei Einbringung der Röhrchen in gewöhnlicher horizontaler Lage, aber in ungleichen Abständen von der Oberfläche zeigte ferner ein am Grund der Magensaftprobe liegendes Röhrchen eine geringere Verdauungslänge als ein in der Oberflächenschicht befindliches, da hier die Konzentration der Verdauungsprodukte geringere Werte erreicht, als am Grund.

Durch den behinderten Stoffaustausch wird außer den Eiweißspaltprodukten höchst wahrscheinlich auch die Pepsinmenge — und damit auf das direkteste die Reaktionsgeschwindigkeit — betroffen, die sich in jedem Moment in der an die Eiweißflächen angrenzenden Schicht befindet; denn die Produkte der Pepsinverdauung können, wenn sie in größeren Quantitäten vorhanden sind, vermöge ihrer Bindungsfähigkeit gegenüber dem Ferment merkliche Mengen davon dem Substrat entziehen, ein Umstand, der vielleicht die von Sawjalow³⁾ angeführte Tatsache zu erklären vermag, daß eine Durchtränkung der von ihm benutzten Gelatine mit Pepsin vor der bei niedriger Temperatur bewerkstelligten Koagulation ein ganz anderes Verhalten des Substrats bei der Verdauung bedingt, als wenn die Gelatineröhrchen erst nach der Koagulation mit dem Enzym in Berührung gebracht werden⁴⁾. Bei vorheriger „Beladung“ der Röhrchen mit Pepsin hat

¹⁾ Nierenstein u. Schiff, Archiv f. Verdauungskrankh. 8 (1902) 559.

²⁾ Korn, loc. cit. S. 179, Fußnote 1, S. 33.

³⁾ Sawjalow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47 (1905) 307.

⁴⁾ Hinsichtlich der Beeinflussung des Verdauungsprozesses durch Salze gilt dieses ungleiche, ja hier häufig geradezu entgegengesetzte Verhalten von „enzym-beladenen“ und unbeladenen Eiweißröhrchen, wie Pons, Arch. int. de pharm. et de thérap. 17 (1907) 247, gezeigt hat, ebenfalls.

das Substrat eben schon alles Ferment, dessen es zu seiner Aufspaltung bedarf, auf sich fixiert, so daß es unabhängig ist von dem Bindungsvermögen wechselnder Mengen von Verdauungsprodukten gegenüber freiem Pepsin.

Doch muß für die Erklärung der Sawjalowschen Beobachtung wohl in noch höherem Maße dem Umstand Beachtung geschenkt werden, daß durch die „Beladung“ die Wirkungsfläche des Pepsins eine ganz andere geworden ist. Die Umsetzung beschränkt sich nun nicht mehr auf die Endflächen, sondern die erste Phase des Prozesses, die Fermentbindung, findet vielmehr gleichmäßig durch die ganze Masse hindurch statt, und ein Fortschreiten der Reaktion setzt in dem Momente ein, wo in einer Substratpartie die Bedingungen für den Abfluß der reaktionshemmenden Spaltprodukte gegeben sind, dies ist aber an den freien Enden.

Zu untersuchen wäre auch, inwieweit eventuell die von Palitzsch und Walbum¹⁾ festgestellte Abhängigkeit der Gelatinekoagulation von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung eine Störungsquelle darstellt²⁾.

Bis zu einem gewissen Grade können die im vorigen erwähnten Mängel des Stoffaustausches bei der Mettschen Methode durch starke Verdünnung der auf die Eiweißröhrchen einwirkenden Pepsinlösungen, vielleicht auch schon durch eine Herabsetzung der Verdauungstemperatur beseitigt werden, da mit der hierdurch bedingten Verlangsamung des Prozesses Zeit für einen besseren Stoffausgleich gewonnen wird. Auch dürften weitere Röhrchen vorteilhafter als enge sein. In der Tat lassen sich nun auch, wie Nierenstein und Schiff³⁾ gezeigt haben, brauchbare Resultate mit Hilfe der Mettschen Methode erhalten, wenn für eine ausreichende Verdünnung des betreffenden Magensaftes gesorgt wird, womit einmal schon direkt durch Herabsetzung der Konzentration der hemmenden Stoffe (zu denen nach den

¹⁾ Palitzsch u. Walbum, *Compt. rend. Laborat. Carlsberg* 9 (1912) 200; *Biochem. Zeitschr.* 47 (1912) 1.

²⁾ Die optimale Wasserstoffionenkonzentration variiert mit der Temperatur. Bei 6%iger Gelatine und 0,4%o Pankreatin-Rhenania betrug dieselbe bei 30° 10^{-3,9}, bei 37° 10^{-3,7}, bei 45° 10^{-3,1}, bei 45° 10^{-3,0}. Bei tieferen Temperaturen liegt danach das Optimum bei einer größeren OH⁻-Ionenkonzentration als bei höheren Temperaturen. Die Lage des Optimums scheint auch nicht unabhängig vom Substrat und vor allem nicht von der angewandten Bestimmungsmethode zu sein, da Michaelis u. Davidsohn, *Biochem. Zeitschr.* 36 (1911) 780, ebenfalls für Pankreatin-Rhenania bei 37° das Optimum bei einer H⁺-Ionenkonzentration von 10⁻⁸ feststellten, als sie das Trypsinpräparat auf Pepton-Riedel einwirken ließen und die Zunahme der Aminosäuren mittels Formoltitrierung nach Sörensen ermittelten.

³⁾ Nierenstein u. Schiff, *loc. cit.* S. 184, Fußnote 1.

genannten Forschern nicht nur die Verdauungsprodukte, sondern auch die gelösten Kohlenhydrate¹⁾ und Kochsalz zu rechnen sind), dann aber auch indirekt durch Verlangsamung des Verdauungsprozesses und die damit verbundene Besserung des Stoffausgleichs weit günstigere Bedingungen für einen normalen Reaktionsverlauf geschaffen werden. Die anzuwendenden Verdünnungen, welche mit $\frac{1}{20}$ -normaler Salzsäure (0,18% HCl) hergestellt werden, müssen so beschaffen sein, daß die Länge des in 24 Stunden gelösten Eiweißzylinders nicht mehr als 3,6 mm beträgt. Gewöhnlich reicht eine 16fache Verdünnung aus; findet man jedoch, nachdem man zwei der mit Eiweiß beschickten Röhrchen bei Bruttemperatur der Mischung von 1 ccm Magensaftfiltrat und 15 ccm $\frac{1}{20}$ -normaler Salzsäure²⁾ überlassen hat, eine größere Verdauungslänge als 3,6 mm, so muß der Versuch mit einer 32fachen Verdünnung wiederholt werden. Das Mittel der vier Verdauungslängen ins Quadrat erhoben und mit 16 bzw. 32 multipliziert, gibt den relativen Pepsingehalt des unverdünnten Magensaftes, wobei also diejenige Pepsinmenge als Einheit betrachtet wird, welche bei der gegebenen Azidität von 0,18% Salzsäure 1 mm Eiweiß der Mettschen Röhrchen in 24 Stunden verdaut.

Die soeben angeführte Berechnung des relativen Pepsingehaltes aus den bei der Methode von Mett sich ergebenden Verdauungslängen läßt jenes quadratische Abhängigkeitsverhältnis zwischen Pepsinmenge und Wirkung erkennen, mit dem wir uns schon im *Allgemeinen Teil* eingehend befaßt haben, so daß von einem besonderen theoretischen Kapitel in diesem Abschnitt Abstand genommen werden kann. Es

¹⁾ Euler, Allg. Chem. d. Enzyme, 1910, S. 98, bringt dies mit ihrer sterischen Konfiguration in Zusammenhang, eine Annahme, die zu interessanten Konsequenzen führt. Man kann sich — wie mir scheint — vorstellen, daß der mit der Asymmetrie der Kohlenstoffatome im Pepsin wie im Substratmolekül zusammenhängende Verankerungsvorgang, welcher der Substratspaltung vorausgeht, durch die Gegenwart einer Substanz mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen eine Störung erleidet, indem es nunmehr zu einer Verteilung des Pepsins zwischen den beiden asymmetrischen Stoffen kommt, wodurch dem Substrat ein größerer oder geringerer Anteil des Ferments entzogen und die Spaltung dementsprechend verlangsamt wird. Doch sind auch Bindungen anderer Art in Betracht zu ziehen; z. B. unter Beteiligung der den Fermenten zugeschriebenen Aldehydgruppe, ähnlich wie der Formaldehyd Bindungen mit Glukose und Maltose eingeht (Maggi, loc. cit.; Woker, loc. cit.).

²⁾ Es kommt hierbei nicht auf die absolute Pepsinquantität, also auf die größere oder geringere Flüssigkeitsmenge an, sondern nur auf die Pepsinkonzentration.

sei daher nur das für die Beherrschung der Methode von Mett wie auch der übrigen Verfahren wichtige über die Gesetzmäßigkeiten der Pepsinwirkung auch an dieser Stelle angeführt. Es ist dies um so notwendiger, da als Kriterium dafür, daß unter den angegebenen Bedingungen die Mettsche Methode brauchbare Werte gibt, hier wie bei den anderen Verfahren die Uebereinstimmung mit dem quadratischen Fermentgesetz betrachtet wird, welches, unabhängig von Schütz, Borissow ¹⁾ gerade bei dieser Methode aufgefunden hat ²⁾. Allerdings ist von Sawjalow ³⁾ auf Grund seiner Versuche mit derselben Methode das Vorhandensein eines quadratischen Abhängigkeitsverhältnisses zwischen dem Pepsingehalt und der Menge des gelösten Eiweißes in Abrede gestellt und statt dessen Proportionalität zwischen der Pepsinmenge und der Quantität der Verdauungsprodukte angenommen worden. Sawjalow hat aber, wie schon erwähnt, unter ganz besonderen Versuchsbedingungen gearbeitet und für sein einfaches Proportionalitätsgesetz findet sich keine andere Bestätigung, als die Angabe von Groß ⁴⁾ und Cobb ⁵⁾, daß die verdaute Eiweißmenge der Fermentquantität direkt, der Verdauungszeit dagegen umgekehrt proportional sei. Doch ist dieses Resultat, welches Groß mittels seiner im folgenden beschriebenen Methode aufgefunden hat, durch K. Meyer ⁶⁾ mit dem Fuldsehen Edestinverfahren und von Reichel ⁷⁾ nachgeprüft und als auf unrichtigen Annahmen beruhend dargelegt worden. Zudem brauchten die beiden Annahmen durchaus nicht in Widerspruch zueinander zu stehen, da Sawjalow die Richtigkeit der Beobachtungen nicht in Abrede stellt, welche E. und J. Schütz ⁸⁾, Borissow ⁹⁾ und Linossier ¹⁰⁾ zu dem Satz geführt haben, daß die Quadratwurzel aus der Pepsinmenge proportional der gelösten

¹⁾ Borissow, Ueber Pepsinogen und Uebergang desselben in wirksames Pepsin, Dissert., Petersburg 1891.

²⁾ Siehe auch Wojwodoff, Ueber die Methoden der Pepsinbestimmung und das Fermentgesetz, Dissert., Berlin 1907.

³⁾ Sawjalow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47 (1905) 307.

⁴⁾ Groß, Berl. klin. Wochenschr. 45 (1908) 643.

⁵⁾ Cobb, Amer. Journ. Physiol. 13, 448.

⁶⁾ K. Meyer, Berl. klin. Wochenschr. 45 (1908) 1485.

⁷⁾ Reichel, Wiener klin. Wochenschr. (1908) Heft 30, S.-A.

⁸⁾ E. Schütz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 9 (1885) 577; J. Schütz, Ebenda 30 (1900) 1; E. Schütz u. Huppert, Pflügers Archiv 80 (1900) 470; siehe ferner Schütz, Wiener klin. Wochenschr. (1908) 729.

⁹⁾ Borissow, loc. cit. Fußnote 1, diese Seite.

¹⁰⁾ Linossier, Journ. physiol. pathol. générale 1 (1899) Nr. 2; zitiert nach Sahli, Lehrb. d. klin. Untersuchungsmethoden, 6. Aufl., 1913, Bd. I, S. 615.

Eiweißquantität sei. Nur sollte nach Sawjalow eine derartige Beziehung nicht der Pepsinwirkung eigentümlich sein, sondern in dem „Verteilungsgesetz des Pepsins zwischen Wasser und Eiweißgel“ seine Ursache haben, und zwar wäre die Ungleichheit der Molekülgröße des Ferments in den beiden Phasen der direkte Grund der quadratischen Beziehung. In diesen Ausführungen Sawjalows steckt aber nichts anderes als eine Erklärung des Schützschens Fermentgesetzes, wie sie auf anderem Wege, nämlich durch Dissoziation des Pepsinmoleküls Hofmeister zu geben versucht hat. Nach der letzteren Erklärung, welche ich im *Allgemeinen Teil* der Katalyse¹⁾ den Verhältnissen bei der katalytischen Wirkung schwacher Säuren²⁾ an die Seite gestellt habe, und für welche früher schon Arrhenius³⁾ in einer (mir erst nach der Drucklegung des *Allgemeinen Teils* der Katalyse durch Eulers Referat in seiner *Allgemeinen Chemie der Enzyme* bekannt gewordenen) ausführlichen Abhandlung den Nachweis einer außerordentlichen Analogie⁴⁾ mit dem Verhalten schwacher Basen wie dem Ammoniumhydroxyd bei der Esterverseifung⁵⁾ erbracht hat, würde durch die Dissoziation des inaktiven Fermentmoleküls der aktive Pepsinkomplex erst gebildet und zwischen dessen Menge und der verdauenden Kraft des Magensaftes bestände dann die von Sawjalow angenommene direkte Proportionalität. Mit dieser Vorstellung einer Dissoziation des inaktiven Fermentmoleküls würde auch die Ansicht von J. Loeb⁶⁾, daß das Pepsinkation den wirksamen Bestandteil darstellt, in völligem Einklang stehen. Die Funktion der Salzsäure bei der Pepsinverdauung wäre dementsprechend zu suchen in einer Bildung des stärker dissoziierten Chlorwasserstoffsalzes⁷⁾ und der dadurch bedingten Aktivierung des Pepsins durch Bildung des Pepsinkations. Vielleicht kann diese Akti-

¹⁾ *Allg. Teil*, S. 164.

²⁾ Esterspaltung und Rohrzuckerinversion kommen an erster Stelle in Betracht.

³⁾ Arrhenius, Medd. Nobel Inst. 1 (1908) Nr. 9; zitiert nach Euler, *Allg. Chem. d. Enzyme*, Wiesbaden 1910, S. 95.

⁴⁾ Euler, loc. cit. vorige Fußnote, S. 98, läßt es dahingestellt, ob sich alle für die Pepsinverdauung wesentlichen Tatsachen den Arrheniusschen Ableitungen für die Esterverseifung durch Ammoniak fügen [so z. B. die Bindung der Salzsäure bei der Pepsinverdauung, mit der sich Jastrowitz, *Biochem. Zeitschr.* 2 (1907) 157, beschäftigt hat].

⁵⁾ Arrhenius, *Zeitschr. f. physik. Chem.* 1 (1887) 124.

⁶⁾ J. Loeb, *Biochem. Zeitschr.* 19 (1909) 534.

⁷⁾ Siehe Euler, *Ergebnisse d. Physiol.* 6 (1907) 187.

vierung durch Salzbildung direkt mit derjenigen des Pepsinogens identifiziert werden. Es wäre dann das Pepsin einfach als das Salz des Pepsinogens zu betrachten¹⁾.

In gleicher Weise könnte man nach Loeb die Wirkung des Trypsins auf die Abspaltung von aktiven Anionen aus dem inaktiven Fermentkomplex zurückführen und den Einfluß des Alkalis demgemäß der Bildung eines Alkalitrypsinsalzes von stärkerer Dissoziationsfähigkeit zuschreiben (Trypsinogenaktivierung?). Immerhin muß hier berücksichtigt werden, daß die Abhängigkeit der Verdauungsgeschwindigkeit von der Tryptasemenge, wie auch die übrigen Gesetzmäßigkeiten noch keineswegs klargestellt sind.

Für das auf die Gelatine einwirkende tryptische Enzym, die Glutrinase, fand Pollack²⁾ eine angenäherte Uebereinstimmung mit dem Schützschens Gesetz. Bayliss³⁾ findet dagegen nach der Leitfähigkeitsmethode im ersten Viertel der tryptischen Verdauung von Kaseinnatrium angenäherte Proportionalität. Schon im zweiten Viertel ist dagegen die Reaktionsgeschwindigkeit viel geringer, als man der Trypsinkonzentration nach erwarten sollte, und je mehr der Umsatz zunimmt, desto unabhängiger ist er von der Fermentkonzentration⁴⁾. Taylor⁵⁾ stellt für das Protaminsulfat aus Salm beim Hydroxylionenoptimum einfache Proportionalität zwischen Verdauungsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration fest; und dasselbe fand Walters⁶⁾ bei der tryptischen Hydrolyse des Kaseins, wobei sich, im Gegensatz zu

¹⁾ Ebenso könnte man das quadratische Abhängigkeitsverhältnis, soweit man dasselbe auch bei anderen Fermenten aufgefunden hat (siehe darüber außer im folgenden auch *Allg. Teil* der Katalyse, loc. cit. vorige Seite, Fußnote 1, S. 164 u. 165), auf den Uebergang des entsprechenden Zymogens in das aktive Enzym zurückführen.

²⁾ Pollack, Hofmeisters Beitr. 6 (1904) 95.

³⁾ Bayliss, Arch. Sciences Biol., Suppl. 11, Petersburg 1904. S. 261.

⁴⁾ Siehe hierzu und für die Abhängigkeit von der Substratkonzentration die Berechnung der Versuchsergebnisse durch Arrhenius, Immunochemie, 1907, S. 51. Arrhenius bediente sich der Gleichung:

$$a (\log a - \log x) + x - a = k \cdot t.$$

a bedeutet die Leitfähigkeit nach beendigtem Versuch, x die Leitfähigkeit zur Zeit t und k eine Konstante (320). Bis zu 4%igen Kaseinlösungen besteht zwischen Geschwindigkeitskonstante und Substratkonzentration Proportionalität, wie auch Walters (loc. cit.) festgestellt hat. Zwischen 4—8% ist die Konstante von der Kaseinmenge unabhängig, und bei Konzentrationen, die mehr als 8% betragen, steigt die Geschwindigkeit mit fallender Substratkonzentration.

⁵⁾ Taylor, On fermentation, Berkeley (1907) 152.

⁶⁾ Walters, Journ. Biol. Chem. 11 (1912) 267, 12 (1912) 43.

der Autohydrolyse der Kaseinsalze, kein nennenswerter Einfluß der Natur der verwendeten Base ¹⁾ bemerkbar machte. Es scheint lediglich auf die Hydroxylionenkonzentration anzukommen, für welche Bayliss (loc. cit.) innerhalb enger Grenzen Proportionalität zur Reaktionsgeschwindigkeit annimmt ²⁾. Löhlein ³⁾ und Faubel ⁴⁾ konstatieren gleichfalls keine Unterordnung der Trypsinverdauung unter das Schützche Fermentgesetz, sondern einfache Proportionalität zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Fermentkonzentration. Madsen und Walbum ⁵⁾ (Thymolgelatineversuche) sowie Hedin ⁶⁾ (Kaseinversuche) fanden das Produkt: $F \cdot t = k$.

Bei den Versuchen von Madsen und Walbum bedeutet t die Zeit, die der Verdauungsprozeß bis zum Moment des Ausbleibens der Kältekoagulation der Gelatine in Anspruch nimmt und F die Anzahl Kubikzentimeter Fermentlösung.

Im heterogenen System konstatierte Palladin ⁷⁾ bei konstanter Eiweißoberfläche, daß die verdaute Eiweißmenge dem Ferment ^{2/3} proportional war, und bei der Methode von Mett hängt es offenbar von der Natur des Fermentes ab, ob das quadratische (Pawlow) oder das einfache Proportionalitätsgesetz gültig ist. Nach R. O. Herzog und Kasarnowski scheint letzteres immer bei künstlichen Fermentpräparaten zu bestehen. Im Anschluß an diese Befunde sei erwähnt, daß V. Henri und Languier des Bancels ⁸⁾, welche die Spaltung von Gelatine und Kaseinnatrium mittels der Leitfähigkeitsmethode (siehe im folgenden) verfolgten, zeigten, daß die Leitfähigkeitsänderung der Quadratwurzel aus den Verdauungszeiten ⁹⁾ ungefähr proportional ist ¹⁰⁾.

¹⁾ Die basischen Barium- und Kalziumsalze autohydrolysieren ungefähr 3mal so rasch wie die basischen Natrium- und Lithiumsalze des Kaseins.

²⁾ Siehe auch Robertson u. Schmidt, Journ. Biol. Chem. 5 (1908) 31.

³⁾ Löhlein, Hofmeisters Beitr. 7 (1905) 120.

⁴⁾ Faubel, Hofmeisters Beitr. 10 (1907) 35.

⁵⁾ Ueber Madsens und Walbums Versuche siehe Arrhenius' Immunochemie, 1907, S. 50, 87.

⁶⁾ Hedin, Journ. Physiol. 32 (1905) 468, 34 (1906) 370; Zeitschr. f. physiol. Chem. 57 (1908) 468.

⁷⁾ Palladin, Archiv f. d. ges. Physiol. 137 (1910) 337.

⁸⁾ V. Henri u. Languier des Bancels, Compt. rend. 136 (1902) 1581 und loc. cit. Fußnote 10, diese Seite.

⁹⁾ Siehe hierzu die Berechnung von Arrhenius, Immunochemie, 1907, S. 53.

¹⁰⁾ In bezug auf die Abhängigkeit von der Substratkonzentration haben Henri u. Languier des Bancels, Compt. rend. Soc. Biol. 55 (1903) 787, 789, 876, im Beginn der tryptischen Spaltung die monomolekulare Reaktionsgleichung gültig befunden.

Auch sei der Versuche von Weis¹⁾, die sich auf die proteolytischen Malzfermente beziehen, hier gedacht.

Alle diese widerspruchsvollen verschiedenen Angaben dürften mindestens zum Teil in der Inhomogenität des Trypsins ihre Ursache besitzen, bricht sich doch immer mehr die Auffassung Bahn, daß das als Trypsinwirkung in die Erscheinung tretende Bild einer totalen Spaltung des genuinen Eiweiß durch die Uebereinanderlagerung der Wirkung zweier Enzyme zustande kommt: einer analog den Pepsinasen — aber sich von diesen durch die Wirksamkeit im alkalischen Medium unterscheidende²⁾ — nur die proteolytische Phase des Eiweißabbaus vermittelnden Protease und einer die Polypeptidbindungen der ersten Spaltprodukte angreifenden Peptase. Alle Trypsinpräparate würden, entsprechend dieser Auffassung, als wechselnde Gemische dieser beiden Fermentkomponenten zu betrachten sein³⁾.

Ob nun für das Pepsin die vorhin erörterte Erklärungsweise durch Fermentdissoziation oder diejenige von Sawjalow den Tatsachen besser entspricht, dürfte durch die in bezug auf die Gültigkeit des Quadratgesetzes ausgeführte Prüfung der Pepsinbestimmungsmethoden, bei welchen das Ferment auf gelöstes Eiweiß einwirkt, entschieden sein. Denn, trägt nach Sawjalows Annahme nur das zweiphasige System die Schuld an der quadratischen Beziehung, so wird dieselbe nicht zutage treten, wenn man die Verdauung im homogenen System sich vollziehen läßt. Im Falle einer Dissoziation des indifferenten Fermentkomplexes⁴⁾ in einen aktiven und in einen inaktiven Anteil kann dagegen im heterogenen wie im homogenen System das Schütztsche Gesetz Gültigkeit beanspruchen. Da nun

¹⁾ F. Weis, Compt. rend. du Laborat. de Carlsberg 5 (1903) Heft 3.

²⁾ Nur bei den Proteasen, die sich in Pflanzenorganen und in den keimenden Samen der Pflanzen finden, würde es sich nach Vines, Ann. of Bot. 18 (1904) 289, 19 (1905) 149, 171, 20 (1906) 113, 22 (1908) 103, 23 (1909) 1, 24 (1910) 213, um die Kombination von Pepsinasen und Peptasen handeln. Siehe auch Weis, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31 (1900) 79; Compt. rend. des trav. du Lab. de Carlsberg 5 (1903) 3.

³⁾ Siehe z. B. Oppenheimer, Die Fermente, 4. Aufl. 1, 1913, S. 437 bis 439; siehe auch Ebenda S. 426 u. 427.

⁴⁾ Der Frage, ob außer der Bildung eines Eiweißchlorhydrats, welches leichter zerfällt als freies Eiweiß (Euler, Allg. Chem. d. Enzyme, 1910, S. 133), auch die Bildung eines Pepsinsalzes der Salzsäure, einer „Pepsinchlorwasserstoffsäure“ [J. Loeb, Biochem. Zeitschr. 19 (1909) 534; Euler, loc. cit. S. 133 und Erg. d. Physiol. 6 (1907) 187] in Betracht kommt, sind wir schon vorher näher getreten. (Ueber die Einwirkung von Säuren auf Eiweiß vgl. auch die Arbeit von Goldschmidt, Dissert., Straßburg 1898.)

Schütz selbst an gelöstem Eiweiß gearbeitet hat, und da auch spätere an Eiweißlösungen ausgeführte Verdauungsversuche, wie diejenigen von Sjöqvist¹⁾ und Herzog²⁾, auf das quadratische Fermentgesetz geführt haben, so muß diesem letzteren eine andere Ursache zugrunde liegen, als Sawjalow vermutet hat.

Eine weitere Erklärung für das Gesetz von Schütz, welche dieser selbst, gemeinsam mit Huppert³⁾ entwickelt hat, stützt sich auf die Vorstellung, daß die Ursache des quadratischen Abhängigkeitsverhältnisses in der stetigen Abnahme des Ausgangsmaterials zu suchen sei. Durch den Nachweis der Gültigkeit der nämlichen Beziehung bei der Mettschen Methode durch Borissow (loc. cit.) fällt jedoch diese Erklärung dahin, da hier dem einwirkenden Pepsin in jedem Moment dieselbe Eiweißoberfläche dargeboten wird, was mit dem ununterbrochenen Ersatz der gelösten Eiweißmenge gleichbedeutend ist. Die Bedingungen, unter denen die genannten Forscher Proportionalität zwischen dem Pepsingehalt und der Menge der gebildeten sekundären Albumosen annehmen, wären also vollkommen erfüllt, was schon Schütz durch die Einbeziehung der Säurekonzentration bei der Formulierung seines Gesetzes berücksichtigt und Sörensen⁴⁾ durch die Feststellung einer optimalen Konzentration der Wasserstoffionen auf elektrometrischem Wege erwiesen hat.

Aber gleichviel welche Theorie für das Zustandekommen des quadratischen Abhängigkeitsverhältnisses auch gelten mag, keinesfalls wird dadurch die Verwendung des Schütz'schen Gesetzes als Kriterium für die Brauchbarkeit einer Pepsinbestimmungsmethode in Frage gestellt. Bei dem eminent hemmenden Einfluß der Eiweißspaltprodukte und sonstiger dem in Untersuchung genommenen Magensaft beigemengter gelöster Substanzen sowie Störungsquellen anderer Art muß man den Fingerzeig dankbar hinnehmen, den das quadratische Fermentgesetz darbietet. Denn hierdurch allein können wir uns über die mehr oder weniger engen Grenzen orientieren, welche der Anwendbarkeit jeder Pepsinbestimmungsmethode und ganz besonders derjenigen von Mett gezogen sind. Wo man mit dem Fermentgesetz nicht übereinstimmende Resultate erhält, wird man jedenfalls gut daran tun, erst der Störung nachzugehen, ob die Natur des Probefrühstücks oder gestaute proteolytische, oder auch andere Verdauungsprodukte⁵⁾

¹⁾ Sjöqvist, Skand. Archiv f. Physiol. 5 (1895) 277, 6 (1895) 255.

²⁾ Herzog u. Margolis, Zeitschr. f. physiol. Chem. 60 (1909) 298.

³⁾ Huppert u. Schütz, Pflügers Archiv 80 (1900) 470.

⁴⁾ Sörensen, Medd. fra Carlsberg Lab. 8 (1909) 1; Biochem. Zeitschr. 21 (1909) 131, 201, 22 (1909) 352.

⁵⁾ Welchen Einfluß diese Stoffe besitzen, zeigt ja am besten der Befund Schapir os (siehe Fußnote 3, folgende Seite), daß bei der Volhardschen Methode reine Pepsinlösungen regelmäßig dem Fermentgesetz entsprechende Werte liefern,

(Kohlenhydrate usw.) einer früheren Mahlzeit die Schuld tragen, oder die Methode als solche¹⁾, bevor man das Schütztsche Fermentgesetz innerhalb der für dessen Gültigkeit theoretisch gezogenen Grenzen²⁾ in Zweifel zieht. Ich möchte dies nicht, wie es Marie Schapiro³⁾ tut, auf die Bestimmung des „wahren Pepsingehaltes“ eines Magensaftes beschränken, sondern auch die Ermittlung der „Verdauungskraft des unverdünnten Magensaftes“ dieser Kontrolle unterstellen. Doch ist anzunehmen, daß sich dann jede heute im Gebrauch befindliche Methode außer derjenigen von Grünhagen, bei welcher allein die Eiweißspaltprodukte das Reaktionsgleichgewicht verlassen, als unzureichend erweisen wird. Das heißt es ist überhaupt nicht möglich, zum mindesten nicht für die späteren Stadien der Verdauung, die tatsächliche physiologische Verdauungskraft eines Magensaftes zu messen, solange wir im Reagenzgefäß unter gänzlich unphysiologischen Verhältnissen arbeiten. Denn während im Magen für eine ununterbrochene Wegschaffung der hemmenden Verdauungsprodukte gesorgt ist, häufen sich dieselben bei den künstlichen Verdauungsversuchen ungehindert an und bedingen dann Erscheinungen, wie sie am schlagendsten bei den Versuchen nach Mett hervortreten, wo es nicht selten vorkommt, daß der unverdünnte Magensaft eine geringere verdauende Kraft entwickelt, als ein mehrmals verdünnter. Es ist dies ein Umstand, der schon allein genügt, die Unbrauchbarkeit der Methode von Mett in der ursprünglichen Form, die neuerdings Kaiserling⁴⁾ wieder in Vorschlag gebracht hat, darzutun. Der Zweck, den die Messung der „Verdauungskraft des unverdünnten Magensaftes“ verfolgen soll, Aufschluß darüber zu geben, „wie tatsächlich zur Zeit des Probefrühstückes die Verdauungsbedingungen liegen“, ist unter allen Umständen auf diesem Wege nicht erreicht, und es dürfte dieser Messung daher auch nicht die klinische Bedeutung zukommen, die ihr zugeschrieben wird⁵⁾; wenigstens nicht, solange hier wie auch bei anderen Methoden, z. B. derjenigen von Grützner, die Verdauungsprodukte nicht durch eine

während diese Uebereinstimmung bei Magensäften nur in einem Teil der Fälle vorhanden war. Siehe hierüber auch Küttner, Zeitschr. f. physiol. Chem. (1907).

¹⁾ Eventuell auch nur eine bestimmte Ausführungsart derselben.

²⁾ Siehe darüber die im folgenden erwähnten Feststellungen von Arrhenius (S. 212, 213), sowie auch im vorigen (S. 188).

³⁾ Marie Schapiro, Ueber die Volhardsche Methode der Pepsinbestimmung, Inaug.-Dissert. aus der Klinik Sahli, Bern 1909.

⁴⁾ Kaiserling, Berl. klin. Wochenschr. 40 (1903) 1007.

⁵⁾ So auch von Schorer, Ueber die refraktometrische Pepsinbestimmung. Inaug.-Dissert. aus der Klinik Sahli, Bern 1908, S. 32 u. 33.

geeignete dialytische Vorrichtung eliminiert werden. Doch ist man auch dann nicht sicher, daß diese letztere den natürlichen Verhältnissen entspricht, obgleich zweifellos eine recht weitgehende Anpassung erzielt werden kann, namentlich seit die einfacheren, doch schon gegen strömendes Wasser dialysierenden und für die Einstellung in den Thermostaten eingerichteten Apparate, wie sie Proskauer, Kühne, Kronecker¹⁾, Wroblewski²⁾, Jordis³⁾, van Calcar⁴⁾, Wiechowski⁵⁾ u. a. zum Teil gerade mit Rücksicht auf Verdauungsversuche konstruiert haben, zu Dialysiervorrichtungen weiter entwickelt worden sind, die in irgendeiner Weise den Bewegungen und den mechanischen Faktoren überhaupt Rechnung tragen, unter welchen sich die Verdauung in vivo vollzieht. So hat schon Gürber⁶⁾ den Dialysierschlauch, welcher das Verdauungsgemisch enthält, auf einer Schüttelmaschine befestigt. Der ingenieure Schnelldialysator, welchen Thoms⁷⁾ konstruiert hat, wird selbst in rasche Umdrehungen versetzt. Beim Dialysator von Siegfried⁸⁾ hält ein Rührer die dialysierende Flüssigkeit in Bewegung. Sheridan Lea⁹⁾ versucht die Bewegungen beim natürlichen Verdauungsvorgang durch abwechselndes Senken und Heben des Dialysierschlauches nachzuahmen, und Pupo¹⁰⁾ hat in noch viel energischerer Weise die Bedingungen bei der Verdauung im Magendarmkanal dadurch nachgeahmt, daß er den Pergamentbeutel, der das Verdauungsgemisch enthält und in welchem — entsprechend dem natürlichen Sekretionsvorgang — Magensaft ununterbrochen aus einem Reservoir nachgeliefert wird, durch einen Blasebalg allseitig zusammendrückt und wieder ausdehnt. Der ganze Apparat wird durch Erwärmen auf einem Sandbad auf 40° gehalten.

Bei einem rasch funktionierenden dialytischen oder filtrierenden Apparat läßt sich so der unter günstigsten Bedingungen für die Re-

¹⁾ Kronecker, Beitr. z. Anat. u. Physiol. (Festgabe für Karl Ludwig), Leipzig 1874, S. 130; siehe ferner Wolffhügel, Archiv f. d. ges. Physiol. 7 (1873) 188.

²⁾ Wroblewski, Zeitschr. f. angew. Chem. (1894) 692.

³⁾ Jordis, Zeitschr. f. Elektrochem. 8 (1902) 677.

⁴⁾ van Calcar, Berliner klin. Wochenschr. 42 (1904) 1028, (1905) 1372; Dialyse, Eiweißchemie und Immunität, Leiden und Leipzig 1908, S. 11.

⁵⁾ Wiechowski, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 9 (1907) 232.

⁶⁾ Gürber, Verhandl. d. physik.-med. Ges. zu Würzburg 28 (1894) 21.

⁷⁾ Thoms, Ber. d. chem. Ges. 50 (1917) 1235.

⁸⁾ Siegfried, Ebenda 31 (1898) 1825.

⁹⁾ Sheridan Lea, Journ. Physiol. 11 (1890) 226.

¹⁰⁾ Pupo, Recherches exp. sur la digestion artificielle de l'albumine, Thèse de Genève 1899.

sorption erreichbare Maximalwert der Verdauungskraft eines Magensaftes feststellen, ein Wert, der nicht unwichtige Aufschlüsse zu geben vermag. Doch hat man auch damit nur eine Komponente ermittelt, die den zeitlichen Verlauf der natürlichen Verdauung dominiert. Zweifellos wird dieser Prozeß durch die qualitative und quantitative Beschaffenheit des Probefrühstücks, für welches verschiedene untereinander stark variierende Vorschläge¹⁾ bestehen, erheblich in Mitleidenschaft gezogen. Hat doch Arrhenius²⁾ bei Berechnung der Versuchsergebnisse von London³⁾ über die Verdauung im Hundemagen gefunden, daß sowohl bei gewöhnlicher Fleischnahrung wie bei Brot, Hühnereiweiß⁴⁾ und Gliadin⁵⁾ die zur völligen Verdauung erforderliche Zeit der Quadratwurzel aus der per os eingeführten Nahrungsmenge proportional ist, indem die Beziehung gilt: $t = 0,342 \sqrt{M}$, worin t die Verdauungszeit und M die Nahrungsmenge bedeutet. Des weiteren ergab sich die Beziehung, daß die verdaute Menge anfangs der Zeit nahezu proportional ist und erst später langsam abnimmt, eine Diskrepanz mit der Schützschenschen Regel, welche Euler⁶⁾ auf die Wegschaffung der hemmenden Endprodukte bei den Versuchen in vivo zurückführt.

Wiederum andere Gesetzmäßigkeiten ergaben sich bei der Einführung des Fleisches durch Fistel. Mit der Geschwindigkeit der Pepsinsekretion bei einem Individuum muß endlich ebenfalls gerechnet werden, denn ob auch unter pathologischen Verhältnissen die von Herzog⁷⁾ nach Versuchen von Chigin und Lobassow⁸⁾ berechnete Formel einer monomolekularen Reaktion gültig ist, erscheint fraglich.

Kehren wir nach diesen Erörterungen allgemeinerer Art wieder zu der Methode von Mett zurück, so lassen sich leider mit einer

¹⁾ Albertkakes, die Sahlische Mehlsuppe, das besonders empfehlenswerte Eigelbprobefrühstück usw.

²⁾ Arrhenius, Medd. Nobel Inst. 1 (1909) Nr. 44; Zeitschr. f. physiol. Chem. 63 (1909) 323; vgl. jedoch Grützner, Archiv f. d. ges. Physiol. 141 (1911) 112.

³⁾ London, Zeitschr. f. physiol. Chem. 45 (1905) 381, 60 (1909) 191, 194, 267; London u. Dobrowolskaja, Ebenda 60 (1909) 270; London u. Riwsch-Sandberg, Ebenda 60 (1909) 274.

⁴⁾ London, Zeitschr. f. physiol. Chem. 49 (1906) 359, 56 (1908) 405.

⁵⁾ London, Zeitschr. f. physiol. Chem. 56 (1908) 394.

⁶⁾ Euler, loc. cit. S. 143.

⁷⁾ Herzog, Zeitschr. f. allg. Physiol. 4 (1904) 163; Zeitschr. f. physiol. Chem. 41 (1904) 425.

⁸⁾ Chigin u. Lobassow, Dissert., Petersburg 1896; siehe auch Arrhenius, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63 (1909) 323 (an Fistelhunden ausgeführt).

ausreichenden Verdünnung nicht alle Fehlerquellen beseitigen. Denn auch bei peinlichster Einhaltung der Verbesserungsvorschläge, die von seiten der Nachprüfer der Methode¹⁾, namentlich Samojloff²⁾ und Nirenstein und Schiff (loc. cit.) angegeben worden sind³⁾, haftet der Methode eine relativ sehr beträchtliche Ungenauigkeit in der Ablesung an. Die mikroskopische Ablesung mittels des Objektivmikrometers (in $\frac{1}{10}$ mm geteilt)⁴⁾ kann nicht sehr viel mehr als die makroskopische leisten, da der Uebergang zwischen fester und flüssiger Phase unscharf ist, worauf M. Potakow-Pracaitis⁵⁾ wie auch Korn⁶⁾ hingewiesen haben. Dieselben erwähnen als weitere Fehlerquelle auch die nicht immer zu vermeidende Bildung von Luftbläschen im Inneren bei der Herstellung von Eiweißzylindern. Endlich hat Kaufmann⁷⁾ gezeigt und aus dem Grund die ganze Methode verworfen, daß ungleiches Alter und ungleiche Qualität, wozu auch die geringen Differenzen in der Temperatur und Dauer der Koagulation beitragen, ein ganz verschiedenes Verhalten der Eiweißsäulen bedingen können⁸⁾. Bis zu einem gewissen Grad lassen sich jedoch wenigstens die letzteren Fehlerquellen, mit denen die bequemste aller Pepsinbestimmungsmethoden⁹⁾ behaftet ist, vermeiden, und es ist sogar, gegenüber dem völlig ablehnenden Urteil von Henrotin¹⁰⁾, Jo-

¹⁾ Vgl. jedoch die Angaben auf folgender Seite.

²⁾ Samojloff, Arch. Sciences Biol., St. Petersburg 2 (1893) 699; Pharm. Ztg. f. Rußland 33, 309.

³⁾ So empfiehlt Samojloff die sofortige Unterbrechung der Verdauung in den Röhrchen durch Einbringen in Eis.

⁴⁾ Ueber eine Ablesungsvorrichtung für Lupe siehe H. Meier, Berl. klin. Wochenschr. 43 (1906) 347.

⁵⁾ M. Potakow-Pracaitis, Influence de quelques aliments et principes alimentaires sur la quantité et la qualité du suc gastrique, Dissert., Lausanne 1901 (gedruckt in Genf).

⁶⁾ Korn, loc. cit. Fußnote 3, S. 176.

⁷⁾ Kaufmann, Archiv f. Verdauungskrankheiten 9 (1903) 562.

⁸⁾ Siehe über die Faktoren, welche die Eiweißzeretzung in den Mettschen Röhrchen beeinflussen, auch Koettlitz, Bull. de la Soc. royale des sciences méd. et naturelles de Bruxelles 8 (1905) 229.

⁹⁾ Auch für die Trypsinbestimmung wird die Methode benutzt, aber selbstverständlich in alkalischer, nicht in saurer Lösung. Pollack, Hofmeisters Beitr. 6 (1905) 95, bedient sich hierzu sowohl mit Gelatine als mit Eiereiweiß oder Pferdeserum beschickter Röhrchen. Beim Arbeiten mit Gelatine muß auch hier der von Palitzsch, loc. cit., festgestellte Einfluß des Sinns und des Intensitätsgrades der Reaktion des Mediums besonders berücksichtigt werden.

¹⁰⁾ Henrotin, Ann. Soc. Royal Sciences méd. de Bruxelles 18 (1909) 2.

hanne Christiansen¹⁾, bei der vergleichenden Prüfung einer Anzahl der wichtigsten Pepsinbestimmungsmethoden²⁾ zum Schluß gekommen, daß die Methode von Mett sehr zu empfehlen ist, wenn sie unter den verschiedenen erforderlichen Kautelen ausgeführt wird.

Nach der Vorschrift von Johanne Christiansen wird das Eiweiß einer Anzahl Eier nach dem Zusammenrühren, Schlagen und Filtrieren in dünnwandige Kapillaren von 0,9—1,5 mm Durchmesser eingesogen und in einem ungefähr 10 Liter fassenden, verschließbaren Kessel nach dem Abkühlen des Wassers auf genau 85° koaguliert. Die erst nach der Abkühlung des Wassers herausgenommenen Röhrchen (von ca. 40 cm Länge) enthalten völlig gleichmäßig (luftblasenfrei) koaguliertes Eiweiß, das sich durch große Verdaulichkeit auszeichnet. Hinsichtlich weiterer Einzelheiten muß auf die Originalarbeit verwiesen werden.

Als Standardlösung bedient sich Johanne Christiansen einer 3%igen Lösung von Armourpepsin in n/10-Salzsäure, welche Verdauungsflüssigkeit in 24 Stunden 10—15 mm der bei 85° koagulierten Eiweißröhrchen verdaut³⁾. Natürlich sind auch alle anderen Verfahren, welche die Lösung von festem Hühnereiweiß zum Gegenstand haben, nicht frei von den Qualitäts- und Altersdifferenzen des Substrats, wie sie bei der Methode von Mett so störend zur Geltung kommen, — und dasselbe gilt für andere feste Substrate, wie z. B. das schon erwähnte erstarrte Hammel- oder Rinderblutserum der Löfflerplatten.

4. Methoden, die sich gelösten Eiweißes irgendwelcher Provenienz bedienen.

Wegen der im vorigen erörterten Nachteile, welche das Arbeiten mit zweiphasigen Systemen mit sich bringt, sind von den verschiedensten Seiten und in reichhaltigster Weise Methoden in Vorschlag gebracht worden, welche die verdauende Kraft einer pepsin- resp.

¹⁾ Johanne Christiansen, Biochem. Zeitschr. 46 (1912) 257.

²⁾ Auch Schorlemmer, Archiv f. Verdauungskrankh. 8 (1902) 229; Jung, Ebenda 8 (1902) 605, der die Methode mit derjenigen von Hammerschlag (siehe im folgenden) verglichen hat, ist dabei zu günstigeren Resultaten für die erstere gekommen.

³⁾ Wohlgemuth, Grundriß der Fermentmethoden, Berlin 1913, S. 152, empfiehlt, zur Herstellung einer Pepsinstandardlösung 1 g des käuflichen Pepsins in 50 ccm destilliertem Wasser aufzuschwemmen und nach dem Durchschütteln 24 Stunden unter öfterem Schütteln aufzubewahren. Danach wird filtriert oder zentrifugiert und die so erhaltene klare Lösung mit dem gleichen Volumen reinsten Glycerins versetzt. Von dieser Stammlösung werden 10- oder 100fache Verdünnungen mit 1%iger Salzsäure, zwecks Vergleichung mit einem Material von unbekanntem Pepsinwirkungswert, hergestellt.

trypsinhaltigen Flüssigkeit an den Veränderungen von Eiweißlösungen verfolgen, wobei sowohl die Messung des Verlustes an Ausgangsmaterial (bzw. die Quantität des noch koagulierbaren Eiweißes)¹⁾, wie die Ermittlung des im Verlauf der Verdauung stattfindenden Zuwachses an Spaltprodukten in Betracht kommt.

I. Verfahren zur Ermittlung einer partiellen Aufspaltung des nativen Eiweißes zu nicht mehr fällbaren Produkten.

a) Gewichtsanalytische Methoden zur Messung des Eiweißverlustes.

Den Eiweißverlust bestimmt Krüger²⁾, indem er auf eine Lösung von käuflichem Hühnereiweiß, deren Eiweißkonzentration vor dem Versuch bestimmt wird, eine Lösung von 1 g Pepsin³⁾ während 20—24 Stunden bei 37° einwirken läßt und dann in der mit Normalnatronlauge genau neutralisierten Lösung durch Aufkochen mit einer Spur Essigsäure das noch vorhandene Eiweiß ausfällt, dessen Gewicht nach der Filtration durch ein gewogenes Filter festgestellt⁴⁾ und von der ursprünglichen Eiweißmenge in Abzug gebracht wird.

Zu gleicher Zeit ist von Thomas und Weber⁵⁾ ein ähnliches gewichtsanalytisches Verfahren zu demselben Zweck empfohlen worden. Diese Forscher geben zu einer 0,2—0,3%igen Salzsäurelösung reines Kasein und die zu prüfende pepsinhaltige Flüssigkeit, überlassen das Reaktionsgemisch während 1 Stunde sich selbst, fällen hierauf das unangegriffene Kasein durch 20%ige Natriumsulfatlösung, filtrieren es und wägen den gewaschenen und getrockneten Niederschlag. Auch hier gibt die Gewichts Differenz der natürlich in gleicher Weise behandelten Kaseinniederschläge vor und nach der Verdauung ein Maß für die Pepsinwirkung und — bei entsprechender Abänderung — auch für die tryptische Wirksamkeit.

¹⁾ Siehe z. B. auch Oppler, Archiv f. Verdauungskrankh. 2 (1896) 40.

²⁾ Krüger, Zeitschr. f. Biol. von Voit [N. F.] 23 (1901) 378 (der ganzen Folge 41. Bd.).

³⁾ Pepsinum german. Witte.

⁴⁾ Zuvor muß der Niederschlag durch sukzessives Auswaschen mit heißem Wasser, Alkohol und Aether gereinigt und bis zur Gewichtskonstanz bei 110 bis 120° getrocknet werden.

⁵⁾ Thomas u. Weber, Zentralbl. f. Stoffwechsel u. Verdauungskrankh. 2 (1901) Nr 14, zitiert nach Schapiro, loc. cit. S. 193, Fußnote 3. S. 9.

b) Volumetrische Methoden zur Messung des Eiweißverlustes.

An Stelle des Gewichtsvergleichs hat Korn¹⁾ bei Versuchen, die Methode von Bidder und Schmidt zu vereinfachen, ein Verfahren angegeben, bei welchem er, so wie dies Vernon²⁾ für die Bestimmung des Trypsins empfohlen hat (loc. cit.), in einer der Pepsinwirkung unterworfenen Eiweißlösung das vorhandene Eiweiß ausfällt, zentrifugiert und die Eiweißmenge aus der Höhe des Niederschlags in den graduierten Gläschen durch direkte Ablesung ermittelt.

Korn weist selbst auf die Uebelstände dieser Methode hin, die einmal in der Schwierigkeit der Ablesung, bedingt durch die Neigung der Niederschlagsflächen in den Zentrifugengläschen, dann aber auch darin bestehen, daß der unter verschiedenen Verdauungsbedingungen erhaltene Eiweißniederschlag auch ungleiche Konsistenz besitzt.

Viel verbreiteter ist eine andere, völlig analoge volumetrische Bestimmungsmethode. Bei diesem von Hammerschlag³⁾ für die klinische Pepsinbestimmung ausgearbeiteten Verfahren werden 5 ccm Magensaft zu 10 ccm einer Hühneralbuminlösung, die 1% Eiweiß⁴⁾ und 3—4% Salzsäure⁵⁾ enthält, gegeben und gleichzeitig mit einer Kontrollprobe, die an Stelle des Magensaftes destilliertes Wasser enthält, in den auf 37° angeheizten Brutofen gebracht. Nach 1 Stunde wird in beiden Proben der Eiweißgehalt bestimmt und die Differenz als Maß für die verdauende Kraft des Magensaftes betrachtet.

Dem berechtigten Einwand, daß die Esbachsche Eiweißbestimmung an und für sich ungenau ist und ferner an dem Uebelstand leidet, daß die Albumosen mitgefällt werden⁶⁾, suchen Bettmann und Schröder⁷⁾ dadurch zu begegnen, daß sie an Stelle des Esbachschen Reagens eine 10%ige Trichloressigsäure als Fällungsmittel verwenden. Immerhin leidet die Methode auch in dieser verbesserten

¹⁾ Korn, loc. cit. S. 176, Fußnote 3, S. 23.

²⁾ Vernon, Journ. Physiol. 26 (1901) 405.

³⁾ Hammerschlag, Internat. klin. Rundschau 8 (1894) 1393.

⁴⁾ Frisches Hühnereiweiß enthält ungefähr 13% Trockeneiweiß.

⁵⁾ Als Verdünnungsflüssigkeit empfiehlt es sich, direkt eine $\frac{1}{10}$ -normale Salzsäurelösung (0.36%) zu nehmen und von ausgeschiedenem Globulin abzufiltrieren.

⁶⁾ Doch ist diese letztere Fehlerquelle, die eine geringere Wirkung des Magensaftes vortäuscht, nach Sahli, Lehrb. d. klin. Untersuchungsmethoden, Bd. I, 6. Aufl., Leipzig u. Wien 1913, S. 615, von untergeordneter Bedeutung, da die Albumosen in viel zu feiner Form ausfallen, um die Höhe des Niederschlags in nennenswertem Maße zu verändern.

⁷⁾ Bettmann u. Schroeder, Med. Record, Oktober 1903; Archiv f. Verdauungskrankh. 10 (1904) 599.

Ausführung daran, daß nicht eine fortgesetzte Kontrolle des Verdauungsvorganges möglich ist, da sie nur das Resultat nach der willkürlich gewählten Verdauungszeit von 1 Stunde in Rechnung zieht. Die ohne Zweifel auch hier vorhandenen Störungen von seiten der Verdauungsprodukte usw. fallen aber gerade unter solchen Umständen schwer ins Gewicht, und noch weit schlimmer bestellt ist es aus diesem Grunde bei Verfahren wie bei demjenigen von Krüger, wo die Verdauungszeit auf 20—24 Stunden ausgedehnt wird.

c) Methoden, die auf der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl basieren.

Hierher gehört die ebenfalls auf eine Verdauungszeit von 19 bis 20 Stunden abstellende Pepsinbestimmungsmethode von Croner¹⁾, bei welcher der Eiweißgehalt der nach besonderer Vorschrift bereiteten Eieralbuminlösung vor und nach der Verdauung mit Hilfe der Kjeldahlschen Stickstoffbestimmung ermittelt wird.

Oppenheimer und Aron²⁾ sowie O'Sullivan³⁾ ermitteln den Stickstoff an dem nach einer bestimmten Verdauungszeit noch koagulablen Eiweiß.

Diesen Methoden gegenüber steht diejenige von Hedin⁴⁾, welcher als Maß für die verdauten Kaseinmengen den durch Gerbsäure nicht fällbaren Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt, also auf die Ermittlung der Verdauungsprodukte abstellt. Für das Trypsin ergab sich hierbei, daß nur die Quantität des schon gespaltenen Eiweißes für den Verlauf der Verdauung maßgebend ist, gleichviel ob dieses durch viel Enzym in kurzer Zeit oder durch wenig Enzym während eines längeren Zeitraums gebildet worden ist. Wie weit hier die Bindung an die Spaltprodukte, wie verschiedene andere Substanzen von Einfluß ist, deren Aufnahmevermögen gegenüber Tryptasen auch Hedin⁵⁾ befürchtet, bleibe dahingestellt. Dasselbe Prinzip liegt auch der Pepsinbestimmung von Sjöqvist mittels koaguliertem, in Pulverform suspendiertem Eiweiß zugrunde. Das native Eiweiß wird entfernt und der Stickstoffgehalt des nicht gefällten Anteils ermittelt.

¹⁾ Croner, Virchows Archiv [14] **10** (1897) 260 (der ganzen Folge 150. Bd.).

²⁾ Oppenheimer u. Aron, Hofmeisters Beitr. **4** (1903) 279.

³⁾ O'Sullivan, Journ. Soc. Chem. Ind. **24**, 830.

⁴⁾ Hedin, Journ. of physiol. **32** (1905) 468; **34** (1906) 370; Zeitschr. f. physiol. Chem. **57** (1908) 471.

⁵⁾ Hedin, Zeitschr. f. physiol. Chem. **50** (1907) 497; siehe ebenda **63** (1909) 143.

II. Verfahren zur Ermittlung einer totalen Aufspaltung des nativen Eiweiß zu nicht nachfällbaren Produkten.

Auf die Bestimmung der gebildeten Verdauungsprodukte selbst läuft das Verfahren von Allen¹⁾ hinaus, welcher der Albumosen und Peptone getrennt in quantitativer Weise habhaft zu werden sucht, indem er dem mit 0,1 g des zu prüfenden Pepsins und 25 ccm $\frac{1}{10}$ -normaler Salzsäure bei einer Temperatur von 40° überlassenen Verdauungsgemisch²⁾ vorerst nach genauem Neutralisieren mit $\frac{1}{10}$ -normaler Natriumkarbonatlösung durch 10 Minuten langes Erhitzen auf 90°, Abkühlen, Auffüllen mit Wasser auf 100 ccm und Filtrieren das unveränderte Eiweiß sowie das Syntonin entzieht, dann in 50 ccm des Filtrates die Albumosen durch Zusatz von ca. 60 g gepulvertem Zinksulfat ausfällt, wiederum filtriert und das Filtrat mit Bromwasser zur Abscheidung der Peptone behandelt. Der Albumose- wie der Peptonniederschlag wird hierauf zur Bestimmung des Stickstoffs noch feucht nach Kjeldahl verbrannt.

Zunächst möge ein Verfahren von Arrhenius³⁾, welches den Uebergang zu den zwei folgenden Methoden bildet, hier seinen Platz finden. Es besteht darin, daß konstante Mengen gelöster Thymolgelatine und Salzsäure, mit wechselnden Pepsinquantitäten vermischt, während einer bestimmten Zeit auf 36,6° C gehalten werden, worauf man die Verdauung durch Einbringen der Proben in den Eisschrank unterbricht. Es wird nun die Grenzkonzentration für den Pepsin-gehalt aufgesucht, die dadurch charakterisiert ist, daß sie alle Gelatine eben zu verflüssigen vermag, während bei allen geringeren Fermentkonzentrationen mehr oder weniger Gelatine durch die Abkühlung zum Erstarren gebracht wird. Ganz in derselben Weise — nur bei alkalischer Reaktion des Mediums — können die Trypsasen bestimmt werden, und es ist dieses Prinzip auch schon früher von Fermi⁴⁾ für die Praxis der Trypsinbestimmung nutzbar gemacht worden. Fermi verwendet eine 5%ige, in der Kälte erstarrende Chloroformgelatine — hergestellt durch Auflösen von 50 g Goldblattgelatine in 1 Liter Wasser, welches 5 ccm Chloroform enthält —, fügt je 2 ccm derselben (nach

¹⁾ Allen, Pharm. Journ. (1897) 561.

²⁾ Allen stellt sich das zu verdauende Material in der Weise her, daß er etwa 1 g pulverisiertes, käufliches Eiweiß in 20 ccm warmem Wasser löst, worauf er im siedenden Wasserbad das Eiweiß koagulieren läßt und abkühlt.

³⁾ Arrhenius, Immunochemie, Leipzig 1907, S. 46.

⁴⁾ Fermi, Archiv f. Hygiene 12 (1891) 238, 40 (1906) 155.

der Vorerwärmung auf 38°) zu den mit absteigenden Mengen der Trypsaselösung beschickten Gläschen, die hierauf 4 Stunden im Brutschrank bei 38° , danach 20 Stunden im Eisschrank sich selbst überlassen bleiben. Danach wird die Grenzkonzentration für den Trypsasegehalt durch Feststellung des Gläschens, in welchem gerade die Koagulation ausbleibt und desjenigen, in welchem sie eben noch stattfindet, ermittelt. Da nun aber, wie Palitzsch (loc. cit.) gefunden hat, die Hydroxylionenkonzentration das Koagulationsvermögen der Gelatine sehr erheblich beeinflusst, so betont dieser Forscher die Notwendigkeit, bei vergleichenden Bestimmungen mit derselben Hydroxylionenkonzentration zu arbeiten und Sorge zu tragen, daß dieselbe im Verlauf des Verdauungsversuches nicht variiert. Es geschieht dies durch Zusatz von Borsäure zu der Gelatinelösung¹⁾. Zu je 40 ccm der noch sauer reagierenden Stammlösung werden 8 ccm Natronlauge gefügt und auf 37° während 20 Minuten vorgewärmt, und zwar muß die Natronlauge so konzentriert sein, daß damit die optimale Hydroxylionenkonzentration im Reaktionsgemisch erzielt wird, bei der sich die Trypsinwirkung gegenüber der Gelatine vollzieht ($H^+ \text{ ca. } 10^{-9}$)²⁾. Der Zusatz der Trypsinverdünnung erfolgt in Portionen von je 2 ccm zu den mit Gelatine und Alkali beschickten, vorerwärmten Gläschen. Von Zeit zu Zeit werden je 5 ccm dem Reaktionsgemisch entnommen und in 1 ccm auf Gefriertemperatur abgekühlte Salzsäure gegossen³⁾, die so viel HCl enthält, um die Gelatinelösung gegenüber Lackmus als Indikator zu neutralisieren. Der Konsistenzgrad der koagulierten Gelatine (fest, erweicht, weich, halbflüssig, flüssig) bildet dann ein Maß für den Trypsagehalt.

Statt des Verlusts der Fällbarkeit durch Temperaturänderung

¹⁾ Die Gelatinelösung soll nach der Vorschrift von Palitzsch und Walbum durch Lösen von 700 g französischer Gelatine in $1\frac{1}{2}$ Liter lauwarmem Wasser hergestellt werden. Nachdem die hochgradig visköse Lösung ein Sieb passiert hat, wird sie mit 1 g in Wasser gelöstem emulgiertem Thymol und 12,5 ccm ungefähr 5fach normaler Natronlauge versetzt, auf 2 Liter aufgefüllt und in Portionen von 200 ccm im Eisschrank aufbewahrt. Zu einem Versuch dienen 200 g der Lösung (35%ig), die nun mit 15,5 g reiner, in Wasser gelöster Borsäure versetzt wird. Nach nochmaligem Verdünnen mit Wasser (auf die Portion von 40 ccm wird 10 ccm Wasser zugefügt) resultiert eine Lösung, die im Liter 60 g Gelatine und 12,4 g Borsäure enthält.

²⁾ Die OH^- -Ionenkonzentration ergibt, mit der H^+ -Ionenkonzentration multipliziert, 10^{-14} , die Dissoziationskonstante des reinen Wassers und läßt sich demnach aus der gegebenen H^+ -Ionenkonzentration durch Dividieren in die Konstante berechnen.

³⁾ Die Mischungen müssen mindestens 10 Minuten im Eiswasser verbleiben.

benutzen Groß¹⁾, Grützner²⁾ und Fuld³⁾ den Verlust der Fällbarkeit durch künstliche Fällungsmittel, den die Eiweißkörper bei ihrer Spaltung unter dem Einfluß von Pepsin und Trypsin erleiden. Die von Groß für die Pepsin- wie für die Trypsinbestimmung ausgearbeitete Methode bedient sich der Ausfällung des in Alkali gelösten Kaseins durch verdünnte Essigsäure oder essigsauren Alkohol und sucht an Hand dieser Eigenschaft des Kaseins die geringste Quantität eines Magen- oder Darmsaftes auf, die in 15 Minuten alles Kasein in die nicht fällbaren Spaltprodukte — die Kaseosen oder deren einfache Abbauprodukte — übergeführt hat. Für die Magensaftuntersuchung wird 1 g Kasein⁴⁾ mit 16 ccm einer Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,124 (25% ig an Chlorwasserstoff) in 1 Liter Wasser gelöst⁵⁾. Mit dieser auf 39—40° erwärmten Flüssigkeit werden eine Anzahl Reagenzgläser in Portionen von 10 ccm⁶⁾ beschickt und, mit steigenden Quantitäten des zu prüfenden Magensaftes vermischt, eine Viertelstunde einer Temperatur von 40° ausgesetzt. Danach wird die Fällungsprobe durch Zusatz weniger Tropfen einer konzentrierten Natriumazetatlösung zu jedem Reagenzglas vorgenommen und so die Mischung mit der erforderlichen als Einheit gewählten verdauenden Kraft herausgefunden⁷⁾, bei welcher gerade eben eine Trübung ausbleibt.

Liegt ein tryptischer Saft zur Untersuchung vor, so werden ebenfalls je 10 ccm einer 1%igen Kaseinlösung in gleicher Weise der Einwirkung verschiedener Tryptasemengen ausgesetzt und dann mit 1%iger Essigsäure die Grenze für das Ausbleiben der Fällung aufgesucht. Wohlgemuth⁸⁾ empfiehlt folgende Ausführungsart: 2 ccm der 1%igen Kaseinlösung⁹⁾ werden in die mit absteigenden

¹⁾ Groß, Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 58 (1907) 157; Berl. klin. Wochenschr. 45 (1908) I, 643.

²⁾ Grützner, Archiv f. d. ges. Physiol. 141 (1911) 63.

³⁾ Fuld u. Levison, Biochem. Zeitschr. 6 (1907) 478; Fuld, Bergmann u. K. Meyer, Berliner klin. Wochenschr. (1908) 1673.

⁴⁾ Caseinum purissimum Grübler (hergestellt nach Hammarstens Angaben).

⁵⁾ Auf dem Wasserbad.

⁶⁾ Diese Portion entspricht 0,01 g Kasein.

⁷⁾ 0,02—0,03 ccm sollen bei normalem Magensaft (ausgehebert $\frac{3}{4}$ Stunden nach Einnahme des aus fünf Albertbiskuits bestehenden Probefrühstücks) hinreichend sein, um die 10 ccm der angegebenen Kaseinlösung bis zum völligen Verschwinden der Fällungsreaktion zu verdauen.

⁸⁾ Wohlgemuth, Grundriß der Fermentmethoden, Berlin 1913, S. 187.

⁹⁾ 0,1 g des Kaseins werden mit 5 ccm n/10-Natronlauge und 25 ccm Wasser einmal aufgekocht, abgekühlt, der Natronlaugenüberschuß mit n/10-Salzsäure neutralisiert und auf 100 ccm aufgefüllt. Wegen der schon nach 48 Stunden ein-

Fermentmengen¹⁾ beschickten Gläschen eingetragen und 1 Stunde im Thermostaten von 38° belassen. Danach werden die Gläschen abgekühlt und jedes mit 6 Tropfen essigsauerm Alkohol²⁾ versetzt. Aus der Grenzverdünnung, in welcher gerade eben keine Trübung durch den Zusatz hervorgerufen wird, berechnet sich dann die Anzahl Kubikzentimeter der Kaseinlösung, die von der Tryptaselösung verdaut wurde, nach der Formel:

$$x = \frac{2 \cdot 1}{v},$$

worin 2 die zum Versuch verwendete Menge der Kaseinlösung und v die betreffende Grenzverdünnung, z. B. 0,008, bedeutet. x wäre dann in diesem Fall = 250 Trypsineinheiten³⁾.

Wegen des noch nicht abgeklärten Verhaltens des Kaseins gegenüber Peptasen verlangt die Methode, wie schon früher erwähnt, dort besonders große Vorsicht, wo, wie z. B. bei Fäzesuntersuchungen⁴⁾, Erepsin gleichzeitig vorhanden ist. Im übrigen ist gerade die Verwendung eines Eiweißkörpers, der zu den wichtigsten Bestandteilen der Nahrung gehört, ein großer Vorzug der Methode. Hinzu kommt, daß sich dieselbe zu den verschiedenartigsten Untersuchungen eignet. So hat sie Franke⁵⁾ für die Bestimmung der Leukozytenprotease herangezogen, indem er die abpipettierte und 24 Stunden bei 55° der Autolyse überlassenen Leukozyten in ihrer Wirkung gegenüber einer 1‰igen Kaseinlösung in abgestuften Mengen von 0,1—1 ccm prüft. Es wird das Grenzlöhrchen aufgesucht, in welchem das Kasein gerade eben die Fähigkeit eingebüßt hat, durch ein spezifisches, präzipitirendes Serum in 20 Minuten ausgefällt zu werden.

Grützner⁶⁾ hat ebenfalls neuerdings eine 1‰ HCl enthaltende Kaseinlösung für Pepsinbestimmungen empfohlen. Er benutzt jedoch zur Fällung des unverdauten Kaseins gelbes Blutlaugensalz und zentrifugiert den erhaltenen Niederschlag.

setzenden Trübung empfiehlt sich jedoch mehr eine etwas abweichende Bereitungsweise, nach welcher 0,1 g Kasein in 100 ccm 1‰iger Sodalösung durch Erwärmen gelöst werden.

¹⁾ Die Verdünnungen $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ usw. werden in der gewöhnlichen Weise mit destilliertem Wasser als Verdünnungsmittel hergestellt.

²⁾ 50 Teile 96‰igen Alkohol, 49 Teile Wasser, 1 Teil Eisessig.

³⁾ Unter Trypsineinheit versteht man diejenige Fermentmenge, die bei 38° in 1 Stunde 1 ccm der Kaseinlösung vollkommen verdaut.

⁴⁾ Franke u. Sabatowski, Zentralbl. f. innere Med. 30 (1909) 529; R. Goldschmidt, Deutsche med. Wochenschr. (1909) 522.

⁵⁾ Franke, Wiener klin. Wochenschr. (1910) 1200.

⁶⁾ Grützner, loc. cit. vorige Seite Fußnote 2. S. 203.

Durchaus analog ist die nicht minder bequeme und rasch arbeitende Methode von Fuld ¹⁾, bei welcher, wie vorhin, steigende Mengen des unverdünnten oder mit Salzsäure ²⁾ verdünnten Magensaftes in eine gewisse Zahl von Reagenzgläsern gefüllt werden. Hierauf gibt man in jedes Glas 2 ccm einer Lösung von 1 Teil Edestin ³⁾ in 1000 Teilen der verdünnten Salzsäure und überläßt die Verdauungsgemische während $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur sich selbst. Die Prüfung auf das Ausbleiben der Fällung erfolgt bei diesem Verfahren durch den Zusatz von 0,3 ccm 30 %iger Kochsalzlösung. Aus der Mindestmenge an Magensaft, welche das Verschwinden einer Trübung zu bewirken vermag, läßt sich dann der Pepsingehalt des Untersuchungsmaterials berechnen, indem man die Mindestmenge in die der Anzahl Kubikzentimeter Edestinlösung entsprechende Zahl 2, multipliziert mit der Verdünnungszahl des Magensaftes, hinein dividiert. Entsprechen z. B. 0,2 ccm eines 10fach verdünnten Magensaftes der erforderlichen Mindestmenge, so würde die Anzahl relativer Pepsineinheiten

$$= \frac{2 \cdot 10}{0,2} = 100$$

zu setzen sein.

Für die Bestimmung von Pepsin im Harn, in welchem es sich nur als Zymogen ⁴⁾ findet, muß nach Fuld und Hirayama ⁵⁾ zunächst die Aktivierung in der Weise vorgenommen werden, daß 9 ccm Harn mit 1 ccm normaler Salzsäure während einiger Minuten sich selbst überlassen bleiben. Danach werden eine Reihe Reagenzgläser mit von 1 ccm ⁶⁾ bis 0,2 ccm absteigenden Mengen dieses Gemisches beschickt und mit der Mischung von 30 ccm n/10-Salzsäure + 70 ccm Wasser auf je 1 ccm aufgefüllt. Hierauf erhält jedes Gläschen einen Zusatz von 2 ccm 1 %iger Edestinlösung und die ganze

¹⁾ Fuld u. Levison, Biochem. Zeitschr. 6 (1907) 499.

²⁾ 30 Teile n/10-Salzsäure + 70 Teile Wasser.

³⁾ Edestin ist ein aus Hanfsamen hergestellter Eiweißkörper, der durch die Firma Dr. Gärtner, Halle a. S. bezogen werden kann.

⁴⁾ Daher genügt es auch beim bloßen qualitativen Nachweis nicht, die Fibrinflocke nur in den betreffenden Harn einzulegen. Eine Verdauung derselben findet vielmehr erst dann statt, wenn die betreffende Flocke, nachdem sie sich im Harn während mehrerer Stunden mit dem Ferment beladen hatte, in z. B. 5 ccm 1 %iger Salzsäure übertragen und in den Brutschrank verbracht wird.

⁵⁾ Fuld u. Hirayama, Berliner klin. Wochenschr. (1910) Nr. 25; Zeitschrift f. experim. Pathol. u. Therap. 10 (1912) 2.

⁶⁾ Zur Sicherheit kann außerdem ein Gläschen mit 2 ccm des Harnsalzsäuregemisches angesetzt werden.

Serie kommt für eine Stunde in ein Wasserbad von 38—40°. Danach unterbricht man die Pepsinwirkung durch Einstellen der Gläschen in kaltes Wasser und jedes derselben wird mit 10 (das erste mit 15) Tropfen konzentrierter Kochsalzlösung versetzt. Es wird dann auch hier die Verdünnungsgrenze an Hand der gerade eben ausbleibenden oder noch eben vorhandenen Trübung festgestellt und die Berechnung wie angegeben ausgeführt.

Außer durch die schon erwähnten Vorzüge ist die Edestinmethode noch durch die Einheitlichkeit des Substrates ausgezeichnet und dasselbe kann ihrem Gegenstück, der Pepsinbestimmungsmethode Jacobys¹⁾, nachgerühmt werden, welcher die geringste Pepsin- oder Trypsinquantität aufsucht, die eine trübe Rizinlösung aufzuhellen vermag, eine Methode, die durch Henrotin (loc. cit.) in der Weise modifiziert worden ist, daß er auf die Zeit abstellt, die eine zu messende Pepsinlösung bis zur erfolgten Aufhellung bedarf.

Hata²⁾ bedient sich zur Bestimmung des Pepsins der Aufhellung trüber Eiereiweißlösungen, Rose³⁾ der trüben Lösungen des Erbsenglobulins, und Liebmann⁴⁾ einer Emulsion von koaguliertem Eiweiß, wobei im letzteren Fall als besonderes Moment die Verdünnung einer nicht verdauten Kontrollprobe der Emulsion mit Wasser bis zum selben Aufhellungsgrad hinzukommt, sowie der Vergleich mit einem Standardpräparat von Armourpepsin⁵⁾.

Das Rizin- und das Edestinverfahren sind besonders empfindlich, indem sich mittels Edestin noch 0,000017 g und mittels Rizin noch 0,000021 g Pepsin bestimmen lassen⁶⁾. Es gilt dies jedoch nur bis zu einer bestimmten unteren Aziditätsgrenze. Kongonegative Magensäfte versagen hier im Gegensatz zu anderen Methoden⁷⁾ vollkommen, wie Cohnheim⁸⁾ gezeigt hat.

Handelt es sich um die Ermittlung des Pepsinzymogens neben

¹⁾ Jacoby, Biochem. Zeitschr. 1 (1906) 53; 10 (1908) 229; siehe auch Solms, Zeitschr. f. klin. Med. 64 (1907) 159; Witte, Berl. klin. Wochenschr. 44 (1907) 1338; Einhorn, Ebenda 45 (1908) 1567.

²⁾ Hata, Biochem. Zeitschr. 23 (1909) 184.

³⁾ Rose, Arch. internat. med. 5 (1910) 459.

⁴⁾ Liebmann, Med. Klinik (1909) 1784.

⁵⁾ Siehe ferner die Methode von Bettmann u. Schröder, Med. Record, Oktober 1903; Archiv f. Verdauungskrankh. 10 (1904) 599, bei welcher eine 1%ige Hühnereiweißlösung zu Schaum geschlagen und geprüft wird, wie viel Zeit notwendig ist, damit 1 ccm des zu untersuchenden Magensaftes den Schaum zum Verschwinden bringt.

⁶⁾ Reicher, Wiener klin. Wochenschr. 57 (1907) 1508.

⁷⁾ Untersucht wurden die Methoden von Hammerschlag und Mett.

⁸⁾ Cohnheim, Archiv f. Verdauungskrankh. 16 (1910) 627.

gleichzeitig anwesendem Pepsin, wie dies z. B. bei Extrakten der Magenschleimhaut, wo sich das Zymogen in den Körnchen der Hauptzellen findet, der Fall sein kann, so muß die Pepsinwirkung zunächst durch Zusatz 1%iger Sodalösung ausgeschaltet werden. Nachdem so das sehr alkaliempfindliche Pepsin¹⁾ inaktiviert worden ist, wird mit Salzsäure neutralisiert und gleich danach 2 ccm der Lösung mit derselben Menge n/10-Salzsäure versetzt. Fällt nach dem Salzsäurezusatz die Kongoreaktion ausgesprochen positiv aus, so kann angenommen werden, daß nach 1/4stündigem Stehen aktives Pepsin in genügender Menge vorhanden ist, um durch die Fibrinflockenprobe oder auch auf andere Weise nachgewiesen werden zu können.

III. Physikalisch-chemische Methoden.

a) Zur Messung der Abnahme des nativen Eiweißes.

Die Bestimmung der Viskositätsverminderung. Parallel dem Verlust der Fällbarkeit geht eine erst rasch, dann langsam vor sich gehende Abnahme der Viskosität der dem Proteaseeinfluß ausgesetzten Eiweißlösungen, eine Veränderung, die denn auch von Spriggs²⁾ als Maß für die Wirksamkeit pepsinhaltiger Flüssigkeiten in Vorschlag gebracht worden ist. Wie Spriggs zeigte, enthalten Proben derselben Eiweißlösung³⁾, welche mit ungleichen Pepsinquantitäten behandelt werden, zu Zeiten gleicher Viskosität denselben Prozentgehalt an koagulierbarem und nicht koagulierbarem Eiweiß. Solche Zeiten gleichen Umsatzes quadriert und mit der angewandten Pepsinmenge multipliziert, geben eine Konstante.

Nach Wade würde die Viskositätsveränderung durch die Formel

$$z = -k (Ft)^{2n}$$

ausgedrückt.

¹⁾ Tichomirow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55 (1908) 107, hat allerdings einen Teil (1/4—1/3) des ursprünglich vorhandenen Pepsins in alkalisierten Lösungen dadurch wieder regenerieren können, daß er nur so viel n/10-Salzsäure zusetzt, als einer 1/3-Neutralisation entspricht und das in dieser Weise partiell neutralisierte Gemisch danach 4—6 Stunden bei Zimmertemperatur stehen läßt. Nach dem hierauf erfolgenden Ansäuern mit 1%iger Salzsäure ist Pepsin wieder nachweisbar.

²⁾ Spriggs, Journ. Physiol. Soc. 28 (1902); Zeitschr. f. physiol. Chem. 35 (1902) 465.

³⁾ Die Lösung wird nach Spriggs in der Weise hergestellt, daß 1/2 kg entfettetes, faszienfreies Rindfleisch zerkleinert und bis zur Farblosigkeit des Waschwassers nachgewaschen wird. Hierauf wird dasselbe 24 Stunden in einer Lösung,

Es bedeuten darin k und n Konstanten, t die Zeit in Stunden, F die Fermentmenge und z die noch vorhandene Eiweißmenge, die sich weiter zu verändern vermag.

Das Verfahren, welches geeignet wäre, in der einfachsten und raschest ausführbaren Weise ¹⁾ weitgehende Aufschlüsse über den Verlauf der Verdauung zu geben, soll jedoch nach Bayliss ²⁾ zu keinen zuverlässigen Resultaten führen.

Die fragliche Methode ist von Spriggs an Ostwalds Viskosimeter (73,1 Sek. Durchflußzeit für destilliertes Wasser) ausgearbeitet worden. Doch dürfte sich gerade hier auch das durch Helene Kagan (Inaug.-Dissert. aus der Klinik Sahli, Bern) mit dem Ostwaldschen und dem Hirsch-Beckschen Apparat verglichene und als brauchbar befundene Heßsche Viskosimeter empfehlen, mittels dessen sich in viel kürzerer Zeit als auf irgendeinem anderen Wege Viskositätsbestimmungen ausführen lassen. Der Apparat könnte direkt für Proteasebestimmungen gebraucht werden, indem das Verdauungsgemisch unmittelbar nach dem Zusatz des Pepsins oder Trypsins zu der Eiweißlösung in die Kapillare gesaugt und eine erste Bestimmung ausgeführt wird, wobei man die Durchflußgeschwindigkeit mit derjenigen von Wasser (bzw. mit einer der Azidität oder Alkaleszenz des Verdauungsgemisches entsprechenden Salzsäure- oder Alkalilösung) vergleicht. Von Minute zu Minute könnte dann die Bestimmung wiederholt werden, nachdem zuvor beide Flüssigkeiten bis zur Marke 0 zurückgetrieben worden sind. Auch könnte eventuell der Apparat durch Verlängerung der Kapillaren und Aenderung der Eichung so eingerichtet werden, daß ein solches Zurücktreiben gar nicht erst notwendig ist. Eine solche Anwendung des Heßschen Viskosimeters hätte zugleich den Vorteil, daß Volumenänderungen des Systems, wie sie so häufig bei Hydrolysen, z. B. auch der Stärke beobachtet und analytisch für die Fermentermittlung benutzt worden sind, gleichzeitig festgestellt und auf einem unter dem Einfüllkapillarröhrchen angebrachten Millimeterpapier verzeichnet werden können, nach einem Verfahren, wie es zuerst H. Maggi ³⁾ im Laboratorium der Verfasserin ausgearbeitet hat.

b) Zur Messung der Zunahme der Verdauungsprodukte.

Im Gegensatz zu der überwiegenden Mehrzahl der früher erörterten Verfahren sind wohl für die im folgenden zu besprechenden Aenderungen physikalischer Eigenschaften des Reaktionsgemisches nicht die Ausgangsmaterialien verantwortlich zu machen, sondern die neugebildeten Stoffe.

die auf 2 Liter 16 cem 25%ige Salzsäure enthält, sich selbst überlassen, abfiltriert und das Filtrat für die Viskositätsversuche benutzt.

¹⁾ Siehe im folgenden.

²⁾ Bayliss, Archiv Sciences Biol., Suppl. 11, Petersburg 1904; Journ. of Physiol. 36 (1908) 221.

³⁾ H. Maggi, Fermentforschung 2 (1919) 355—363.

Die Ermittlung des Zuwachses an ionisierten und nichtionisierten Eiweißspaltprodukten. Zur Ermittlung der ersteren ist nach Bayliss (loc. cit.) die messende Verfolgung der sukzessiven Aenderung der elektrischen Leitfähigkeit der Verdauungsgemische geeignet, welche Sjöqvist¹⁾, Oker-Blom²⁾ sowie V. Henri und Larguier des Bancel³⁾ empfohlen haben.

Zunächst könnte eine Veränderung auf der Zunahme an leitenden kristallinischen Aminosäuren auf Kosten nicht leitender Eiweißkomplexe basieren und für die Tryptasebestimmung Verwendung finden. Selbst die Produkte einer partiellen Eiweißhydrolyse würden bei der Empfindlichkeit der Leitfähigkeitsmethode positive Ausschläge geben können. Sjöqvist verfährt bei seiner Anwendung des Leitfähigkeitsprinzips auf einem mehr indirekten Wege, indem er eine salzfreie Hühnereiweißlösung mit 0,2 % Salzsäure versetzt, sowie mit der zu prüfenden Pepsinlösung (in Mengen von 1, 2, 4 und 8). Bis zu vier Stunden wurde der Quotient aus der Leitfähigkeitsänderung und der Quadratwurzel aus der Fermentmenge konstant erhalten:

$$\frac{\Delta}{\sqrt{F}} = k.$$

Die erhaltene einfache Beziehung ist bei der Uebereinanderlagerung verschiedener, in entgegengesetztem Sinne auf die Leitfähigkeit einwirkender Faktoren, die sich im Verlauf der Spaltung einer salzsauren Hühnerealbuminlösung geltend machen müssen, durchaus nicht von vornherein zu erwarten, und es ist auch von Sjöqvist selbst angegeben worden, daß sich die erste Phase des Verdauungsprozesses unter dem Einfluß von Pepsin anders verhält als der spätere Verlauf. Sicher ist wohl nur, daß die Leitfähigkeit in jedem Moment der Spaltung von der freien Salzsäure im Verdauungsgemisch beherrscht wird. Diese hängt aber sowohl vom Salzsäureüberschuß, wie von dem Verhältnis ab, in dem die Geschwindigkeit der (an das Ausgangsmaterial gebundene) Salzsäure in Freiheit setzenden Spaltung des nativen Eiweiß und die Geschwindigkeit der Bindung der Salzsäure an die Spaltprodukte zueinander stehen, sowie vom Grad der Hydrolyse der Chlorhydrate sämtlicher an der Reaktion beteiligten nativen und partiell hydrolysierten Eiweißkörper. Auch die für den Mechanismus der Pepsinwirkung bedeutungsvolle Bindung zwischen Ferment bzw. Pep-

¹⁾ Sjöqvist, Skand. Archiv 5 (1895) 277, 6 (1895) 255.

²⁾ Oker-Blom, Ebenda 13 (1902) 359.

³⁾ V. Henri u. Larguier des Bancel, Compt. rend. 136 (1902) 1581; Compt. rend. Soc. Biol. 55 (1903) 563.

sinogen und Salzsäure kommt als komplizierendes Moment hinzu. Auf alle Fälle liegen die Verhältnisse hier noch verwickelter als bei den im folgenden besprochenen Methoden von Meunier und Volhard, deren innere Wesensverwandtschaft mit der Leitfähigkeitsmethode von Sjöqvist in bezug auf das Maß des Fortschreitens des Verdauungsprozesses nicht zu verkennen ist. Die Abnahme der Leitfähigkeit entspricht wohl direkt der Messung der Abnahme der freien Salzsäure des Reaktionsgemisches nach Meuniers Methode. Mit Rücksicht auf den komplizierten Charakter des Abhängigkeitsverhältnisses von Leitfähigkeit und Verdauungsprozeß sei von weiteren Gesetzmäßigkeiten, die sich nach dieser Methode ergeben, abgesehen ¹⁾.

Für die Tryptase- wie für die Pepsinasebestimmung könnte man ferner an die Messung der nur auf der Aenderung der Molekülzahl beruhenden Zunahme der Gefrierpunktserniedrigung im Verlauf der Verdauung denken, oder an die direkte Messung der Zunahme des osmotischen Drucks analog der von Samec (loc. cit.) für die Verfolgung der Stärkespaltung benutzten Methode. Für die Tryptasebestimmung ist jedoch zweifellos die weit bequemere und ohne Unterbrechung zu verfolgende Messung der Leitfähigkeitsänderung vorzuziehen, und was die Brauchbarkeit dieser Verfahren für die Ermittlung des Pepsingehaltes betrifft, so erscheint dieselbe sehr problematisch wegen der außerordentlich geringen Gefrierpunktserniedrigung selbst der einfachsten Albumosen, die neben der durch die Gegenwart von Salzsäure, Kochsalz, Kohlehydraten usw. bedingten und im Verlauf der Verdauung variierenden Gefrierpunktserniedrigung erst recht nicht zur Geltung kommt, und dasselbe gilt natürlich für das osmometrische Verfahren.

Dagegen kommen, abgesehen von der durch Schiff²⁾ in Vorschlag gebrachten Bestimmung des spezifischen Gewichtes, der keinerlei Bedeutung zukommt, einige andere physikalische Bestimmungsmethoden für die Pepsinasen in Betracht.

Die optischen Methoden. Die älteste dieser Methoden, die polarimetrische, wurde von Schütz³⁾ in Anwendung gebracht⁴⁾. Das Verfahren, welches diesen Forscher auf das quadratische Ferment-

¹⁾ R. O. Herzog in Oppenheimer, Die Fermente 1 (1913) 998, 999.

²⁾ Schiff, Leçons de physiol. de la digestion, 1, Berlin 1887, S. 402.

³⁾ Schütz, loc. cit.

⁴⁾ Ueber die quantitative Bestimmung der Pepsinwirkung mittels Polarisation siehe auch V. Bogdandy, Zeitschr. f. physiol. Chem. 84 (1913) 18.

gesetz führte, beruht darauf, in einer während 16 Stunden bei 37,5° dem Einfluß einer pepsin- und salzsäurehaltigen ¹⁾ Flüssigkeit ²⁾ ausgesetzten Lösung von 1 g globulinfreiem reinem Eialbumin ³⁾ nach der Neutralisation mit 5%iger Natronlauge alles genuine und umgewandelte Eiweiß mit Ausnahme des Peptons (sekundäre Albumosen) in Form der Eisenoxysalze zu fällen und die Peptone hierauf polarimetrisch in der auf die fünffache Konzentration der ursprünglichen Lösung gebrachten Flüssigkeit zu bestimmen.

Die Fällung erfolgt durch Zusatz von etwas Natriumazetat und 5 ccm einer 15%igen Eisenchloridlösung. Danach wird wiederum bis zum Verschwinden der sauren Reaktion Natronlauge zugegeben, auf ca. 500 ccm mit Wasser aufgefüllt, gekocht und nach dem Erkalten die Prozedur wiederholt. Doch werden das zweite Mal nur 0,5 ccm Eisenchloridlösung zugegeben. Läßt sich in der Flüssigkeit kein Eiweiß mehr durch die Ferrozyanwasserstoffprobe nachweisen, so muß die Lösung noch auf das für die polarimetrische Bestimmung erforderliche Volumen gebracht werden, was nach Schütz in der Weise geschieht, daß man die Flüssigkeit stark einengt, auf 250 ccm auffüllt, umschüttelt, über Nacht stehen läßt, filtriert, 200 ccm dieses Filtrates fast bis zur Trockene eindampft und hierauf auf 40 ccm bringt.

Die mit dem 200-mm-Rohr erhaltenen Peptondrehungen resp. die aus diesen Werten durch Division mit 4 . 39,18 ⁴⁾ gefundenen Peptonmengen der untersuchten Flüssigkeiten werden zur Berechnung der relativen Pepsinquantitäten ins Quadrat erhoben. Es stehen dann die relativen Pepsinquantitäten im selben Verhältnis zueinander wie die Quadrate der Peptonmengen oder mit anderen Worten: die Peptonmengen verhalten sich wie die Quadratwurzeln aus den Pepsinquantitäten. Als Pepsineinheit bezeichnet Schütz diejenige Fermentmenge, welche unter den angegebenen Versuchsbedingungen 1 g Pepton zu liefern vermag. Die Umrechnung auf die in 1 ccm einer Pepsinlösung enthaltene Anzahl Pepsineinheiten erfolgt dementsprechend nach der Formel:

¹⁾ Im ganzen soll das mit Wasser auf 100 ccm gebrachte Verdauungsgemisch 0,25 g Chlorwasserstoff enthalten.

²⁾ Schütz arbeitete mit Pepsin, welches er durch Selbstverdauung der Schweinemagenschleimhaut gewonnen und durch anhaltende Dialyse vom Pepton befreit hatte.

³⁾ Entsprechend 9,4 ccm der Lösung, welche Schütz durch Umschütteln von 1 Liter mit 14 ccm Salzsäure (spez. Gewicht 1,12) versetztem und nach mehrstündigem Stehen vom ausgeschiedenen Globulin durch Filtration getrenntem Hühnereiweiß herstellte.

⁴⁾ Siehe im folgenden.

$$P = \frac{1}{p} \left(\frac{m}{4.39,18} \right)^2,$$

worin P die Anzahl Pepsineinheiten, p die Anzahl Kubikzentimeter der verwendeten Pepsinlösung, m die direkt beobachtete Drehung und 4.39,18 die einem Gramm Pepton entsprechende Drehung bedeutet.

Später haben E. Schütz und Huppert¹⁾ in Bestätigung und Ergänzung dieser Ergebnisse das Quadratgesetz in folgender Weise formuliert:

$$S = k \cdot A \sqrt{p \cdot t \cdot s}.$$

Es bedeutet darin S die Menge der polarimetrisch ermittelten sekundären Albumosen²⁾, A die Menge des Ausgangsmaterials, k die Geschwindigkeitskonstante der Verdauungsreaktion, p die Pepsinmenge, t die Verdauungszeit und s die Salzsäurekonzentration.

Die Salzsäurekonzentration darf nicht mehr als 0,2 % betragen, da bei höheren Konzentrationen kleinere Werte erhalten werden, als dem quadratischen Abhängigkeitsverhältnis entspricht. Auch muß genügend Azidalbumin vorhanden sein, welchem, wie den anderen Spaltprodukten („primäre Albumose“ und „Deuteroalbumose“), Schütz und Huppert besondere Beachtung geschenkt haben.

Was die Abhängigkeit von der Menge des Substrates (Eierweiß) betrifft, so ist derselben proportional die Menge der sekundären Albumosen, wie die (zu verschiedenen Zeiten konstante) Summe von primären Albumosen und Azidalbumin, wie auch die Gesamtmenge der Verdauungsprodukte. Auch für das erweiterte Schützsche Gesetz, wenigstens soweit dies die Abhängigkeit des Umsatzes x von der Zeit t betrifft, entsprechend der Formel: $x = q \sqrt{t}$ (q = Proportionalitätsfaktor), ist durch die Ueberlegungen von Arrhenius (loc. cit.) die Analogie zu den bei der Aethylazetatverseifung durch Ammoniak von ihm festgestellten Gesetzmäßigkeiten klargelegt worden.

Für die Geschwindigkeit der Aethylazetatverseifung hatte Arrhenius gefunden, daß sie durch die Gleichung wiedergegeben wird:

$$\frac{dx}{dt} = k \frac{a - x}{x}$$

bzw. integriert:

$$kt = a \cdot \log \frac{a}{a - x} - x.$$

¹⁾ Schütz u. Huppert, loc. cit.

²⁾ Für die primären Albumosen gilt ein ähnliches Abhängigkeitsverhältnis, wenigstens in bezug auf die Zeit.

Zu einer analogen Gleichung gelangt man aber auch durch die Differentiation der ins Quadrat erhobenen Gleichung: $x = q \sqrt{t}$

$$\begin{aligned}x^2 &= q^2 \cdot t \\2x \cdot dx &= q^2 \cdot dt \\ \frac{dx}{dt} &= \frac{q^2}{2} \cdot \frac{1}{x}.\end{aligned}$$

Der Ausdruck $\frac{q^2}{2}$ ist konstant, so daß die letzte Gleichung die Form annimmt:

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot \frac{1}{x}.$$

Im ersten Teil der Reaktion, in dem $a - x$ nahezu konstant bleibt, wird die von Arrhenius für die Aethylazetatverseifung durch Ammoniak aufgestellte Formel gleich der letztgenannten. Die Schützsche Regel gilt nach der Ableitung von Arrhenius in den Grenzen, in denen die Reaktionsgeschwindigkeit sowohl der Menge des umzusetzenden Substrates direkt als der Menge des Umgesetzten umgekehrt proportional ist. Praktisch reicht die Grenze bis zu einem Umsatz von ungefähr 50 % für das Zeitgesetz sowohl, als das Schützsche Gesetz der Proportionalität von Umsatz und $\sqrt{\text{Pepsinmenge}}$. Auch dürfte bei manchen Versuchen eine untere Grenze für dessen Gültigkeit bestehen, da es den Anschein hat (Sjöqvist), als ob die erste, noch mit den Erscheinungen der Adsorption ¹⁾ und Bindung des Ferments an das feste Substrat verknüpfte Phase der Proteolyse (durch welche erst, sei es durch die Bildung „aktiver Moleküle“ nach Euler ²⁾, sei es auf andere Weise die Bedingungen für die weitere Spaltung geschaffen werden) durch andere Gesetzmäßigkeiten beherrscht werde. Jedenfalls dürfte letzteres

¹⁾ Dietz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52 (1907) 279; Bayliss, The nature of enzym action, 1908, S. 59; Derselbe, Proc. Royal Soc. London 84 (1911) 81; Abderhalden u. Steinbeck, Zeitschr. f. physiol. Chem. 68 (1910) 297, 71 (1911) 315, 339. Zur Annahme einer Adsorption zwischen Ferment und Substrat, der dann nach Bayliss (loc. cit.) die chemische Bindung nachfolgen würde, führt auch das Verhalten eines Fermentes zu zwei Substraten, welches Verhalten beim Trypsin und Emulsin von V. Henri u. Languier des Bancel, Compt. rend. Soc. Biol. 60 (1903) 787, 864, 866, 868 u. Hedin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 57 (1908) 468, studiert worden ist und eine Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch die Anwesenheit eines zweiten Substrates ergeben hat.

²⁾ Euler, Allgemeine Chemie der Enzyme, Wiesbaden 1910, S. 3; Zeitschrift f. physik. Chem. 36 (1901) 641, 47 (1904) 353; Zeitschr. f. physiol. Chem. 45 (1905) 447; siehe ferner Arrhenius, Zeitschr. f. physik. Chem. 4 (1889) 232; Wegscheider, Ebenda 39 (1902) 257; Praetorius, Ebenda 41 (1902) 62; Kullgren, Ebenda 51 (1905) 108; Monatsh. f. Chem. 26 (1905) 1.

für Verdauungsversuche im heterogenen und mikroheterogenen System Gültigkeit besitzen. So haben Schütz und Huppert¹⁾ selbst darauf hingewiesen, daß bei der Verdauung von Azidalbumin in der Form von dünnem Kleister das Produkt aus Fermentmenge F und Zeit t eine Konstante ist, wie auch die Versuche von Jacoby (loc. cit.) und ähnliche auf der Aufhellung trüber Eiweißlösungen basierende Verfahren dieselbe Gesetzmäßigkeit $F \cdot t = k$ ergeben haben. Demgegenüber folgt die Aufspaltung des gelösten Azidalbumins zu sekundären Albumosen nach Schütz und Huppert dem Gesetz von Schütz, und auch die Versuche von Herzog und Margolis²⁾ haben für den sofort nach dem Vermischen einer Eialbuminlösung mit Pepsin feststellbaren Verlust der Fähigkeit eines Teils der Eiweißlösung, beim Erhitzen zu koagulieren, zu demselben quadratischen Abhängigkeitsverhältnis geführt, ungeachtet dessen, daß es sich hier um die erste Phase der Pepsinwirkung, die überhaupt bei Lösungen in Betracht fallen kann, handelt.

Was die praktische Wichtigkeit der für die Theorie der Pepsinbestimmung klassischen Methode von Schütz betrifft, so ist dieselbe wenigstens in der üblichen Ausführungsweise viel zu zeitraubend, als daß sie sich gerade für die hauptsächlich in Betracht kommende klinische Magenuntersuchung hätte einbürgern können. Ferner ist gegen das Verfahren geltend zu machen, daß es einen Einblick in den Gang der Verdauung nicht gewährt. Endlich muß auch mit der Ungleichartigkeit der sekundären Albumosen gerechnet werden, welche sich im Verlauf der Verdauung selbst unter völlig analogen Verhältnissen bilden könnten. Schon die geringste Schwankung der qualitativen Zusammensetzung des Gemisches sekundärer Albumosen wäre aber bei dem ungleichen Drehungsvermögen der einzelnen Albumosen imstande, quantitative Unterschiede des gebildeten, von Schütz offenbar noch als einheitlich angesehenen Peptons vorzutäuschen.

Noch weniger als die polarimetrische Methode wird für die Praxis der Magenuntersuchung die quantitative Methode von Klug³⁾ benutzt, welche auf der spektrophotometrischen Bestimmung der Verdauungsprodukte auf Grund der Biuretreaktion beruht.

¹⁾ Schütz u. Huppert, Archiv f. d. ges. Physiol. 80 (1900) 470.

²⁾ R. O. Herzog u. Margolis, Zeitschr. f. physiol. Chem. 60 (1909) 298.

³⁾ Klug, Ungarisches Archiv f. Medizin 3 87; Pflügers Archiv 60 (1895) 43, stellte fest, daß 0,1–0,5%ige Pepsinlösungen am besten verdauen und daß von 0°–50° die Verdauung konstant zunimmt. Von da an nimmt sie ab, um bei 80° zu erlöschen.

Dagegen dürfte sich in größeren Kliniken die elegante refraktometrische Verfolgung der Eiweißspaltung, welche Obermayer und Pick¹⁾ angewandt und welche Schorer²⁾ unter Sahlis Leitung ausgearbeitet hat, häufigerer Anwendung erfreuen. Die beiden Möglichkeiten, die Bestimmung des ungespaltenen Eiweißes durch Feststellung der Differenz der Brechungsexponenten vor und nach der Fällung des genuinen Eiweiß aus dem Verdauungsgemisch von bekanntem Eiweißgehalt, wie die Ermittlung der Quantität der gebildeten Verdauungsprodukte durch Vergleich der Brechungsexponenten am Filtrat einer vor der Verdauung und einer nach der Verdauung von genuinem Eiweiß befreiten Probe, hat Schorer in Betracht gezogen, doch der ersten Arbeitsmethode den Vorzug gegeben. Das refraktometrische Verfahren hat mit zwei großen Fehlerquellen zu kämpfen: mit den Störungen von seiten nicht eiweißartiger Stoffe und mit der Schwierigkeit, das Eiweiß so vollständig auszufällen, daß es von dem äußerst empfindlichen Refraktometer nicht mehr angezeigt wird; doch ist es bei genauer Befolgung der Schorerschen Arbeitsweise möglich, diese Klippen zu vermeiden.

Schorer verwendet für seine Eiweißstammlösung ein Hühneralbuminpräparat, welches durch Austrocknen des Eiweißes auf Glasplatten und Pulverisieren nach der erfolgten Trocknung gewonnen wird, und stellt die durch Toluolüberschichtung haltbar gemachte Flüssigkeit durch entsprechende Verdünnung mit Wasser refraktometrisch auf einen Eiweißgehalt von 0,62% (18,5 Skalenteile bei 17,5° C) ein. 0,1 ccm des zu prüfenden Magensaftes und 4 ccm Normalsalzsäure (Refraktionswert 36,65 Skalenteile) werden nun mit dieser Eiweißlösung auf 50 ccm gebracht, umgeschüttelt und 24 Stunden im Thermostaten bei 38–40° belassen, worauf an 10 ccm der Brechungsindex mit Pulfrichs Refraktometer ermittelt wird. Weitere 20 ccm werden mit Normalnatronlauge (Refraktionswert 43,05 Skalenteile) und Azolitmin als Indikator sorgfältig neutralisiert, ein Tropfen 5%ige Essigsäure zugesetzt, das native Eiweiß durch Kochen vollständig ausgefällt, heiß filtriert, das Filtrat nach dem Erkalten wieder auf 20 ccm gebracht und refraktometriert. Die Differenz dieses und des vor der Fällung ermittelten Brechungsindex ist nach Schorer das Maß der verdauenden Kraft des Magensaftes.

In anderer Weise ist das refraktometrische Verfahren für die Pepsinbestimmung von Robertson³⁾ herangezogen worden, gestützt

¹⁾ Obermayer u. Pick, Hofmeisters Beiträge 7 (1906) 331, haben das Refraktometer zur Untersuchung fermentativer Vorgänge, wie der Glykosidspaltung, der Hydrolyse der Eiweißkörper durch Pepsinasen und Tryptasen, in Vorschlag gebracht.

²⁾ Schorer, Ueber refraktometrische Pepsinbestimmungen, Inaug.-Dissert. aus der Klinik Sahli, Bern 1908.

³⁾ Robertson, Journ. Biol. Chem. 12 (1912) 23.

darauf, daß der Brechungsindex der Gesamtsplaltprodukte während der Verdauung gleich demjenigen des Kaseins bleibt, wenn die Alkalinität $80 \cdot 10^{-5}$ (Äquivalent Na) pro Gramm Kasein beträgt. Nach der Fällung des nicht angegriffenen Kaseins bildet demnach der Brechungsindex ein Maß für die Menge des verdauten Kaseins.

Nach Robertsons Vorschrift werden 2 g Kasein in 16 ccm n/10-Natronlauge gelöst, auf 100 ccm aufgefüllt, verdaut, an Proben von je 10 ccm durch Versetzen mit der gleichen Menge $\frac{1}{40}$ -normaler Essigsäure das unveränderte Kasein ausgefällt und der Brechungsindex der Filtrate ermittelt. Der Brechungsindex des hälftigen Gemisches der verwendeten Essigsäure und Natronlauge wird von den erhaltenen Brechungsindizes in Abzug gebracht, und diese Differenz kommt ganz auf das Konto der Splaltprodukte des Kaseins, deren Menge durch Multiplikation dieses Differenzwertes mit 2 — um der Verdünnung Rechnung zu tragen — und Division durch 0,00152 berechnet wird, da 1 g Kasein in 100 ccm Wasser gelöst, den Brechungsindex um 0,00152 vermehrt.

Weit empfindlicher noch ist eine andere hierhergehörige Methode, die für die verschiedensten Fermentbestimmungen, also auch für die in Frage kommende Ermittlung von Proteasen innerhalb der aus dem folgenden sich ergebenden Grenzen herangezogen werden kann, vorausgesetzt, daß in dem Untersuchungsmaterial nur eine einzige fermentative oder auch andersartige Umwandlung vonstatten geht, die von Aenderungen der Molekelzahl in der Untersuchungsflüssigkeit begleitet ist. Die Methode, deren Ausarbeitung und Nutzenanwendung für die Fermentermittlung das Verdienst von Hirsch ist, bedient sich des Löwe(-Zeiß)schen Interferometers¹⁾, das eine ingeniose Weiterentwicklung eines von Lord Rayleigh angegebenen Prinzipes repräsentiert. Das Interferometer stellt auf den Vergleich zweier Lösungen ab, z. B. der proteasehaltigen Eiweißlösung und der proteasefreien, im übrigen aber zu Beginn des Versuchs äquimolekularen Kontrolleiweißlösung²⁾, und zwar auf Grund der Feststellung einer durch den Unterschied der Lichtbrechung der beiden Proben veranlaßten Wanderung von Interferenzstreifen. Nur wenn der die Dop-

¹⁾ Löwe, Physik. Zeitschr. 11 (1910) 1047; Zeitschr. f. Instrumentenkunde 30 (1910) 321; Haber u. Löwe, Zeitschr. f. angew. Chem. 23 (1910) 1393.

²⁾ Alle Details der Methode finden sich in den Arbeiten von Hirsch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 91 (1914) 440; Deutsche med. Wochenschr. (1914) 1560; Die interferometrische Methode zum Studium der Abwehrfermente in Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 8 (1915) 561; Fermentforschung 1 (1914) 33, 2 (1918) 251; Fermentstudien. Neue Methoden zum Nachweis proteolytischer und lipolytischer Fermente mit besonderer Berücksichtigung der Abwehrfermente, Jena 1917.

pelkammer passierende Lichtstrahl in der mit der zu prüfenden Lösung beschickten Hälfte auf die nämliche Konzentration stößt, wie in der mit der Vergleichslösung beschickten Hälfte, koinzidiert das Interferenzstreifenbild mit der normalen, als Nullage dienenden Interferenzerscheinung¹⁾, welche durch eine besondere Vorrichtung im Apparat erzeugt wird. Fielen bei der ersten Beobachtung, sofort nach der Mischung, die Interferenzstreifen im Apparat zusammen, so wird im Verlauf der Spaltung, in dem Maß, als eine Vermehrung der Molekelzahl vor sich geht, eine zunehmende Verschiebung der Interferenzstreifen die Folge sein und die für ein Wiederzusammenfallen der Streifen erforderliche Drehung ist dann das Maß für die stattgefundene Zunahme der Molekelzahl. Natürlich kann die Methode auch für die Verfolgung fermentativer Synthesen benutzt werden, bei denen umgekehrt eine Abnahme der Molekelzahl der Ausgangslösung und dementsprechend eine Wanderung des Interferenzbildes im entgegengesetzten Sinn das Charakteristikum ist. Die Methode mißt eben einfach Konzentrationsänderungen und zwar die allerminimsten.

Außer ihrer enormen Empfindlichkeit besitzt die Methode den großen Vorteil einer ununterbrochenen Verfolgung der fermentativen Veränderungen in einem Reaktionsgemisch und deren genauesten Messung. Für reine Fermentlösungen, namentlich für solche, die ein Minimum an Aktivatoren (H^+ , OH^+ , Salzionen) bedürfen, und bei der Verwendung durchaus einheitlicher, vor allem auch fett- bzw. lipidfreier Substrate, kann sie daher geradezu als die ideale Meßmethode bezeichnet werden. Für die Untersuchung von Flüssigkeiten des Tier- und Pflanzenreiches ist sie insbesondere für das Gebiet der Abwehrfermente²⁾ von größter Bedeutung. Keinesfalls darf man jedoch bei der Beurteilung der erhaltenen Resultate vergessen, daß die Methode auf Konzentrationsänderungen irgendwelcher Herkunft genau in derselben Weise reagiert. Bakterielle Zersetzungen müssen also ebenso sorgfältig vermieden werden, wie Störungen von seiten eines flüchtigen oder sich polymerisierenden Antiseptikums (z. B. Formaldehyd), wie Verdünnungen durch ein nicht völlig trockenes Substrat oder Konzentrationszunahmen durch Verdunstung oder durch ein quellendes

¹⁾ Diese Interferenzerscheinungen werden repräsentiert durch ein weißes Band — das „Maximum nullter Ordnung“ — und in symmetrischer Anordnung dazu, voneinander durch schwarze Minimastrifen getrennte, Beugungsspektren (Fraunhofersche Beugungserscheinung).

²⁾ Siehe außer den erwähnten Arbeiten von Hirsch, Abderhalden, Fermentforschung 1 (1914) 20, sowie a. a. O.

Substrat¹⁾, oder ein solches, das noch lösliche, z. B. durch die Ninhydrinreaktion nachweisbare Stoffe, die nicht dem proteolytischen Abbau während des Versuchs entstammen, abgeben kann. Auch die Beteiligung eines zweiten spaltenden oder aufbauenden Prinzips, und die Bindung von Salzsäure oder anderen Elektrolyten des Mediums an die Spaltprodukte müssen ausgeschlossen sein. Da das Salzsäurebindungsvermögen der Eiweißspaltprodukte ein so beträchtliches ist, daß sogar, wie im folgenden besprochen wird, Methoden der Pepsinbestimmung auf die Feststellung der Salzsäureabnahme durch die gebildeten Albumosen und Peptone gegründet sind, so würde z. B. bei einer Pepsinbestimmung mittels des Interferometers das erhaltene Resultat einem Differenzeffekt entsprechen, bedingt durch die Uebeerinlagerung einer Molekelzunahme, infolge der Bildung von Albumosen und Peptonen aus nativem Eiweiß, sowie der bei dessen Spaltung frei werdenden Salzsäure und einer Molekelabnahme, infolge der Bindung freier Salzsäure durch die neuentstandenen Produkte. Man muß daher jedenfalls von Pepsinasebestimmungen, z. B. im menschlichen Magensaft²⁾, nach dieser schönen Methode absehen.

IV. Chemische Methoden zur Messung der Zunahme der Verdauungsprodukte.

Auch auf chemischem Wege lassen sich an die Gegenwart der Spaltprodukte der Magen- und Pankreasverdauung geknüpfte Veränderungen des Verdauungsgemisches verfolgen. Zwei hierher gehörige Verfahren wurden schon unter den Methoden, die sich der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl bedienen, besprochen.

Ein einzelnes Spaltprodukt, das durch verschiedene Farbenreaktionen leicht kenntliche Tyrosin, wird häufig zur kolorimetrischen wie auch zur gewichtsanalytischen Bestimmung als Maß für tryptische und peptolytische Verdauungsprozesse herangezogen, worüber sich die Angaben auch schon an früherer Stelle im Abschnitt über die Differenzierung der Proteasen finden.

Um eine direkte chemische Bestimmung der Verdauungsprodukte

¹⁾ Pregl u. de Crinis, Fermentforschung 2 (1917) 58, haben auf eine solche Fehlerquelle hingewiesen, die jedoch nur in vereinzelten Fällen in Frage kommen dürfte.

²⁾ Für keine freie Salzsäure enthaltende tierische Magensäfte könnten die Bedingungen günstiger liegen.

handelt es sich auch bei dem Verfahren, welches Sørensen¹⁾ für die Ermittlung der zu kristallinischen Spaltprodukten führenden Proteasen vorgeschlagen hatte. Dasselbe bezweckt die Titration der im Verlauf der Verdauung gebildeten Aminosäuren durch $\frac{1}{5}$ -normale Kalilauge oder Barytwasser und Phenolphthalein als Indikator, nachdem in 20 ccm der zu untersuchenden Lösung durch 10 ccm Formol die freien Aminogruppen ausgeschaltet worden sind.

Henriques u. Gjaldbaek²⁾ haben die Formoltitrierung von Sørensen in Einzelstadien ausgeführt. Sie neutralisieren zunächst 25 ccm der Untersuchungsflüssigkeit gegen Lackmus, fügen Phenolphthalein hinzu und titrieren mit $\frac{1}{5}$ -normaler Natronlauge bis zur schwachen Rötung (erstes Stadium). Im zweiten Stadium setzen sie weiter $\frac{1}{5}$ -normale Natronlauge zu bis zur starken Rotfärbung; hierauf fügen sie neutralisierte Formollösung bis zum Verschwinden der Rotfärbung und hierauf wieder von der nämlichen Natronlauge hinzu, bis aufs neue schwache Rötung eintritt (drittes Stadium). Endlich vervollständigen sie im vierten Stadium den Natronlaugezusatz bis zur starken Rotfärbung. Bilden sich bei der Eiweißhydrolyse keine freien Aminosäuren, so ist das Verhältnis der für das erste und für das vierte Stadium verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter Natronlauge eng. bei der Bildung von viel Aminosäuren dagegen weit. Auf diesem Wege konnte der stärkere Angriff von Eiweiß bei kombinierter Pepsin-Trypsinverdauung gegenüber der Trypsin-Pepsinverdauung und der Trypsinverdauung allein nachgewiesen werden. Die beiden genannten Forscher betrachten die Eiweißverdauung im wesentlichen als eine Säurespaltung, bei der dem Pepsin nur die Rolle eines Katalysators dieser letzteren zukäme.

Während bei den Methoden nach dem Prinzip von Sørensen auf den Zuwachs an Karboxylgruppen im Verlauf der Spaltung abgestellt ist, wird bei der Methode von van Slyke³⁾ die Zunahme der Aminogruppen im Verlauf der Verdauung bestimmt durch Messung des aus diesen mittels salpetriger Säure in Freiheit gesetzten Stickstoffs.

Nach der Methode von Kober⁴⁾ werden die freien Aminosäuren durch Kochen der neutralisierten Verdauungsflüssigkeit mit überschüssigem, frisch gefälltem Kuprihydroxyd in die Kupferverbindungen übergeführt, das Kuprihydroxyd im Filtrat durch Kochen mit Alkalien abgespalten und seine Menge bestimmt.

Kober verfährt dabei in der Weise, daß er das neutralisierte oder schwach alkalisierte Verdauungsgemisch ungefähr $\frac{1}{4}$ Stunde lang mit überschüssigem Kupferkarbonat oder frischgefälltem Kupri-

¹⁾ Sørensen, Biochemische Zeitschr. 7 (1908) 45; Sørensen u. Jessen-Hansen, Ebenda 7 (1908) 407.

²⁾ Henriques u. Gjaldbaek, Zeitschr. f. physiol. Chem. 75 (1911) 363.

³⁾ van Slyke, Ber. d. chem. Ges. 43 (1910) 3170, 44 (1911) 1684; Journ. Biol. Chem. 9 (1911) 185

⁴⁾ Kober, Journ. Biol. Chem. 10 (1911) 9.

hydroxyd kocht, den Ueberschuß abfiltriert, das Filtrat zum Sieden erhitzt und 5—10 ccm $n/10$ -Alkali hinzufügt. Bei Gegenwart von Aminosäuren bildet sich hierbei ein Niederschlag von Kuprihydroxyd. Tritt dagegen nach einer Kochdauer von einigen Minuten kein Niederschlag auf, so sind keine Aminosäuren vorhanden. Doch können Peptone zugegen sein, deren Kupferverbindungen keine derartige Zersetzung erfahren. Bei reduzierenden Verdauungsgemischen muß das zunächst abgeschiedene Kupferoxydul abfiltriert und die Lösung neutralisiert werden, worauf man nochmals mit Kuprihydroxyd behandelt.

Auf Karboxyl- und Aminogruppen zugleich reagiert das von Abderhalden¹⁾ für den Nachweis der Abwehrfermente eingeführte Ninhydrin (Triketohydrindenhydrat), von welchem 0,2 ccm der wäßrigen 1%igen Lösung beim Kochen mit 10 ccm des auf Eiweißabbaustufen zu prüfenden Dialysats eines Serum-Substratgemisches (z. B. Plazenta oder Tumorgewebe) eine mehr oder weniger intensive Blaufärbung bei Gegenwart solcher Stoffe ergeben. Da Träger der Reaktion die freien Karboxyl- und Aminogruppen sind, so nimmt dieselbe im Verlauf des Eiweißabbaus ungefähr in demselben Maß zu, als die Biuretreaktion abnimmt. Sie ist am stärksten, wenn alle vorhandenen Polypeptidbindungen gelöst und an ihre Stelle die freien Karboxyl- und Aminogruppen getreten sind. Die quantitative Ermittlung des Eiweißabbaus auf diesem Wege, welche Herzfeld²⁾ durch spektrometrische Bestimmung der Farbintensität in Vorschlag gebracht hat, verbietet sich jedoch wegen der ungleichen Permeabilität der Dialysierhülsen und anderer Faktoren, welche die Dialysierfähigkeit in schwer kontrollierbarer Weise beeinflussen, für die Anwendung auf das Dialysat und damit für jede Form der Verfolgung proteolytischer Vorgänge, die auf die Verwendung des Dialyseprinzipes angewiesen ist.

Als Maß für die Menge der unter dem Einfluß des Pepsins gebildeten Umwandlungsprodukte benutzen zwei indirekte, auf entgegengesetzten Prinzipien beruhende Methoden das Salzsäurebindungsvermögen der neu entstandenen Stoffe. Bei dem älteren von Meunier³⁾ angegebenen Verfahren erfolgt die Bildung salzsaurer Albumosen und Peptone auf Kosten der freien Salzsäure des Reaktions-

¹⁾ Siehe z. B. Abderhalden, *Abwehrfermente des tierischen Organismus*, 2. Aufl., 1913, 142 ff.; näheres im folgenden.

²⁾ Herzfeld, *Biochem. Zeitschr.* 59 (1914) 249.

³⁾ Meunier, *Compt. rend. séances Soc. Biol.* (1901), zitiert nach Schapiro, *Inaug.-Dissert.*, loc. cit. Fußnote 4, folgende Seite, S. 10.

gemisches und die Abnahme der freien Salzsäure wird dann messend verfolgt¹⁾, z. B. mittels der von Marie Wezrumba²⁾ in der medizinischen Klinik der Universität Bern auf die Magensaftuntersuchung übertragenen ausgezeichneten Methode von Mohr³⁾.

Viel verbreiteter ist dagegen das zweite Verfahren, bei welchem die Salzsäurebindung von seiten der Albumosen und Peptone auf Kosten des als Verdauungsobjekt dienenden salzsauren Kaseins erfolgt.

In gewissem Sinne ist diese von Volhard⁴⁾ in die Praxis der Pepsinbestimmung eingeführte Methode derjenigen von Grützner zu vergleichen. Wie dort das an das Fibrin gebundene Karmin nach Maßgabe der fortschreitenden Verdauung des Fibrins in Freiheit gesetzt wird, so auch hier die Salzsäure des Kaseins, welche jedoch von den gebildeten Peptonen festgehalten wird und in dieser Bindung der Ausfällung durch Natriumsulfat entgeht.

Statt mittels des Natriumsulfatniederschlages wie Thomas und Weber die Menge des noch unverdauten Eiweißes zu bestimmen, ermittelt Volhard die Menge der entstandenen Peptone, indem er den Aziditätszuwachs des Filtrates im Verlauf der Verdauung auf jene an die Peptone gebundenen Salzsäurequantitäten zurückführt. Je größer der Aziditätszuwachs, desto größer sollte demnach auch die Peptonmenge und desto geringer dementsprechend der mit Natriumsulfat erhaltene Niederschlag des unveränderten Eiweiß sein. Tatsächlich haben denn auch Volhard sowie Löhlein „bei nicht zu hochgradiger Fermentwirkung — wie sie durch zu groß gewählte Magensaftmengen oder zu lange dauernde Verdauung bedingt sein können —“ dem Fermentgesetz entsprechend gefunden, daß sich die Aziditätszunahmen des Filtrates proportional den Quadratwurzeln aus den verwendeten relativen Fermentmengen und den Verdauungszeiten verhalten.

¹⁾ Ueber die sehr genauen, aber zeitraubenden katalytischen Methoden siehe die 1. Abteilung des Spez. Teils dieses Werkes, im Kapitel: Katalyse durch Wasserstoffionen.

²⁾ Marie Wezrumba, Ueber die jodometrische Bestimmung der freien Salzsäure im Magensaft, Inaug.-Dissert. aus der Klinik Sahli, Bern 1911.

³⁾ Schon in Gegenwart von Spuren freier Wasserstoffionen und proportional deren Menge wird in einem Gemisch von Kaliumjodid und jodsaurem Kali Jod in Freiheit gesetzt, welches dann mit Natriumthiosulfat titrimetrisch bestimmt wird.

⁴⁾ Volhard, Münchner med. Wochenschr. 26 (1903) 2129, 32 (1907) 40; Löhlein, Hofmeisters Beitr. 7 (1905) 120; Marie Schapiro, Ueber die Volhardsche Methode der Pepsinbestimmung, Inaug.-Dissert. aus der Klinik Sahli, Bern 1909.

Bedeutend z. B. A_1 und A_2 die Aziditätszunahmen in zwei mit ungleichen Magensaftmengen angestellten Versuchen, t_1 und t_2 die entsprechenden Verdauungszeiten, f_1 und f_2 die Anzahl Kubikzentimeter Magensaft, welche in dem einen oder anderen Fall zur Verwendung kamen, so besteht die Beziehung:

$$A_1 : A_2 = \sqrt{f_1 \cdot t_1} : \sqrt{f_2 \cdot t_2}.$$

Um die Anzahl Pepsineinheiten¹⁾ eines Magensaftes zu bestimmen, verfährt man folgendermaßen:

Man dividiert den Aziditätszuwachs A durch $f \cdot t$ und erhält so den Verdauungswert von 1 ccm Magensaft in 1 Stunde. Da nun 100 ccm des Filtrates zur Titration benutzt werden, die Gesamtflüssigkeit aber 400 ccm beträgt, so muß der erhaltene Wert noch mit 4 multipliziert werden. Um denselben von Kubikzentimetern Magensaft auf Enzymquantität umzurechnen, muß man ihn entsprechend dem Fermentgesetz quadrieren. Die gesuchte Anzahl x der Pepsineinheiten ergibt sich aus der Formel:

¹⁾ Als Pepsineinheit ist nach Volhard diejenige Enzymmenge zu betrachten, welche das Filtrat von 100 ccm der von ihm in Vorschlag gebrachten Kaseinlösung um 1 ccm $\frac{1}{10}$ -normaler Salzsäure saurer macht. An Stelle der von Volhard selbst benutzten, aber schwierig herzustellenden Lösung von salzsaurem Kasein benutzt Löhlein eine sehr haltbare Kaseinnatriumlösung, für deren Bereitung er eine Vorschrift von Weber verwendet. Danach werden 100 g feinkörniges oder gemahlens Kasein mit 1 Liter Aq. dest. unter Schütteln eingeweicht. Sodann gibt man 80 ccm normale Natronlauge zu und füllt mit Aq. dest. auf 2 Liter auf. Man wärmt langsam bis zur vollkommenen Lösung an und erhitzt dann rasch auf 85–90°, um eventuell vorhandene Spuren proteolytischer Fermente unwirksam zu machen. Nach dem Abkühlen setzt man einige Tropfen Toluol zu. 100 ccm dieser Lösung werden unter beständigem Schütteln in eine langhalsige Volhardsche Flasche gebracht, welche zuvor mit 11 ccm normaler Salzsäure (die bis auf 150 ccm mit destilliertem Wasser verdünnt werden) beschickt worden ist. Zu der so bereiteten salzsauren Kaseinlösung fügt man nun die entsprechende Menge des zu prüfenden Magensaftes, füllt mit Wasser auf 300 ccm auf und läßt das Gemisch während einer bestimmten Zeit verdauen. Hierauf wird die Flasche bis auf 400 ccm mit 20%iger Natriumsulfatlösung gefüllt, das unverdaute Kasein abfiltriert, 100 ccm des Filtrates ($\frac{1}{4}$ der Gesamtmenge) mit $\frac{1}{10}$ -normaler Natronlauge und Phenolphthalein als Indikator titriert und die Aziditätsdifferenz gegenüber einer ohne Pepsin in gleicher Weise behandelten Kontrollprobe von 100 ccm der Kaseinnatriumlösung und derselben Menge Salzsäure festgestellt. Gegen die Verwendung der Natriumkaseinlösung an Stelle des salzsauren Kaseins selbst hat übrigens Küttner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52 (1907) 63, geltend gemacht, daß es durch die Neutralisation im Reaktionsgemische selbst zur Bildung von viel den Verdauungsprozeß hemmendem Kochsalz kommt.

$$\frac{A}{\sqrt{x \cdot f \cdot t}} = 1,$$

nach x aufgelöst:

$$x = \frac{A^2}{f \cdot t}.$$

Hinsichtlich dieser der Berechnung des Pepsingehaltes zugrunde liegenden Formel muß jedoch immer im Auge behalten werden, daß das Fermentgesetz nur innerhalb gewisser und relativ enger Grenzen¹⁾ Gültigkeit besitzt, wenigstens für die Magensaftuntersuchung, welche das hauptsächlichste Anwendungsbereich dieser und der anderen Pepsinbestimmungsmethoden darstellt.

Wo es sich nur um die Untersuchung reiner Pepsinlösungen handelt, bestätigt sich dagegen, wie Marie Schapiro (loc. cit.) zeigte (wohl wegen des Fortfallens der Störungen von seiten der im Magensaft vorhandenen gelösten Kohlenhydrate, Salze usw.), die Voraussetzung der Proportionalität zwischen den Quadratwurzeln aus den Pepsinmengen und den Aziditätszunahmen (bzw. den Quantitäten der Verdauungsprodukte) auf der ganzen Linie.

Mit der vorzüglichen Pepsinbestimmungsmethode Volhards kann das am ausgiebigsten bearbeitete Gebiet im Bannkreis der Fermentbestimmung als abgeschlossen betrachtet werden, da dieses oder jenes ebenfalls in Vorschlag gebrachte Verfahren²⁾ bisher keine größere Verbreitung gefunden hat und z. B. die Methode von van Asperen³⁾ überhaupt nur zur Abschätzung des Wirkungswertes empfohlen worden ist.

Die Ermittlung der Peptasekomponente des Trypsins und der Nachweis selbständiger Peptasen (Polypeptidasen).

Während für die Praxis der Pepsinbestimmung wohl so ziemlich jeder theoretische Anhaltspunkt, den der gegenwärtige Stand der Wissenschaft bietet, von erfinderischen Köpfen als Basis von neuen vielfach außerordentlich ingenösen Methoden herangezogen wurde, sind für die Trypsinbestimmung mit der Uebertragung einer großen Anzahl von Pepsinbestimmungsverfahren die vorhandenen Möglichkeiten noch lange nicht erschöpft. Für diesen Zweig der analytischen

¹⁾ Siehe hierüber Marie Schapiro, loc. cit. Fußnote 4, S. 221.

²⁾ Siehe z. B. Illoway, Archiv f. Verdauungskrankheiten 11 (1905) 144; Amer. Journ. med. Sc. 138 (1909) 231.

³⁾ van Asperen, Nederlandsche Maatschappij ter bevordering der Pharm.; zitiert nach Pharm. Zentralh. 33 (1892) 584.

Forschung wurden ganz neue Wege in dem von Emil Fischer, Abderhalden und deren Schülern erschlossenen Gebiet der Polypeptide eröffnet, und dasselbe gilt für die Peptasen, für welche hierdurch erst die Möglichkeit einer exakten Bestimmung gegeben worden ist. So ist von Abderhalden und Gigon¹⁾ und Abderhalden und Koelker²⁾ in dem Glyzyl-L-Tyrosin ein für die optische Tryptasebestimmung geeignetes Spaltungsobjekt gefunden worden, auf welches die von Abderhalden und Michaelis³⁾ für die Polypeptidhydrolysen in Angriff genommene rechnerische Auswertung der Beobachtungsdaten übertragen werden kann.

Gleichviel ob es sich um die Ermittlung einer einheitlichen polypeptidspaltenden Peptase⁴⁾ — einer Polypeptidase — oder um die Bestimmung der peptischen Komponente einer Tryptase z. B. im Blut⁵⁾ oder in klaren sterilen Organpreßsäften⁶⁾ oder im Pankreassekret⁷⁾

¹⁾ Abderhalden u. Gigon, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53 (1907) 251.

²⁾ Abderhalden u. Koelker, Zeitschr. f. physiol. Chem. 54 (1908) 363; 55 (1908) 416.

³⁾ Abderhalden u. Michaelis, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52 (1907) 326.

⁴⁾ Wie die natürlich vorkommenden und viele der von E. Fischer u. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46 (1905) 52, synthetisierten Polypeptide durch Peptasen angegriffen werden, so ist dies auch der Fall für die Biuretbase von Curtius (Triglyzyl-glyzinester), deren Hydrolyse Schwarzschild, Hofmeisters Beitr. 4 (1903) 34, festgestellt hat.

⁵⁾ Ueber die peptische Wirkung des Blutserums oder Plasmas siehe Abderhalden u. Oppler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53 (1907) 294; Abderhalden u. Rona, Ebenda 53 (1907) 308; Abderhalden u. Mc. Lester, Ebenda 55 (1908) 371; Abderhalden, Pincussohn u. Weichardt, Ebenda 61 (1909) 200, 62 (1909) 120 u. 243; Gruber, Zeitschr. f. Immunitätsforschung VII (1910) 762. Ueber die peptische Wirkung der roten Blutkörperchen siehe Abderhalden u. Deetjen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51 (1907) 334, 53 (1907) 280; Abderhalden u. Manwaring, Ebenda 55 (1908) 377. Eine geringe Peptasewirkung zeigen auch die Leukozyten nach Jobling u. Strouse, Journ. of experim. Med. 16 (1912) 270; Biochem. Zentralbl. 14, 802.

⁶⁾ Siehe über Organpeptasen Bergell u. Liepmann, Münchener med. Wochenschr. (1905) 46; Bergell u. Falk, Ebenda (1908) 2217; Savaré, Hofmeisters Beitr. 9 (1907) 141 (Plazentapeptase); Abderhalden u. Ternuchi, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47 (1906) 466, 49 (1906) 1 (Preßsäfte aus Leber und Muskeln verschiedener Tiere); Abderhalden u. Hunter, Ebenda 48 (1906) 537 (Nierenpreßsaft); Abderhalden u. Lussana, Ebenda 55 (1908) 390 (Gehirnpreßsaft und Linsenpreßsaft). Ueber weitere Organ- und Gewebepeptasen siehe Abderhalden u. Steinbeck, Ebenda 68 (1910) 312 (Peptasen in Embryonen); Cohnheim u. Pletnew, Ebenda 69 (1910) 108; Abderhalden, Ebenda 78 (1912) 344; Koblanck u. W. Löb, Biochem. Zeitschr. 29 (1910) 102; Alessandro, Boll. Scienz. Med. [8] IX; Biochem. Zentralbl. 11, 3304 (verschiedene Organe). Ueber die peptische Wirkung erkrankter Organe sind die wenigen vor-

oder endlich in Säften pflanzlicher Herkunft, z. B. im Hefepreßsaft handelt, immer würde man das (wenn erforderlich mit Toluol überschichtete) Gemisch des zu prüfenden Materials mit einer 10%igen Lösung des Glyzyl-L-Tyrosins oder einer gleich konzentrierten Lösung von Seidenpepton (Hoffmann-La Roche, Basel) in physiologischer Kochsalzlösung in das von einem Wassermantel umgebene Innenrohr eines für Temperaturkonstanz gebauten Polarisationsapparates¹⁾ mit dreiteiligem Gesichtsfeld verbringen und sofort nach der Mischung und danach in bestimmten Zeitabständen die Drehung notieren. Bei der Ermittlung der peptolytischen Fähigkeiten von Blutplasma²⁾ oder Serum müssen alle geformten Bestandteile durch sorgfältiges Zentrifugieren mit einer elektrischen Zentrifuge von hoher Tourenzahl zuvor entfernt werden. 1 ccm des zentrifugierten klaren Plasmas (Ammonoxalatplasma, Hirudinplasma usw.) oder Serums werden hierauf mit 1 ccm der Seidenpeptonlösung vermischt, bei Klarheit der Mischung in das $\frac{1}{4}$ -Dezimeterpolarisationsrohr verbracht und dasselbe mit physiologischer Kochsalzlösung mit oder ohne Toluolzusatz bis zum Rand aufgefüllt. Sobald das Gemisch die Versuchstemperatur von z. B. 37° angenommen hat, was längstens nach 5 Minuten der Fall ist, erfolgt die erste Ablesung.

Bei Hefepreßsaft und wahrscheinlich überall dort, wo eine einheitliche Peptase vorliegt, z. B. beim Erepsin, haben Abderhalden und Koelker³⁾ in der messenden Verfolgung der Verminderung des optischen Drehungsvermögens des d-Alanyl-d-Alanins bei dessen Aufspaltung zu dem in wäßriger Lösung fast inaktiven d-Alanin ein vorzügliches Mittel zur Bestimmung dieser Fermente aufgefunden, da die Linksdrehung entsprechend dem Fermentgehalt rascher oder langsamer absinkt und schließlich in Rechtsdrehung übergeht. So lieferte eine

handenen Angaben widersprechend. Verminderung fanden Abderhalden u. Steinbeck, loc. cit. in erkrankten Nieren, sowie Colwell, Arch. Middlesex Hosp. 15 (1909) 96, in verschiedenen chronisch erkrankten Geweben. Bergell u. Lewin, Zeitschr. f. experim. Pathol. 3 (1906) 425, fanden sogar völliges Fehlen der Leberpeptase nach Phosphorvergiftung, während umgekehrt Abderhalden u. Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 49 (1906) 40, im Preßsaft der Phosphorleber eines Hundes eher stärkere peptische Wirkung konstatierten, als beim normalen Hund.

¹⁾ Ueber das Verhalten von Pankreasextrakt und Pankreassaft siehe im folgenden.

²⁾ Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 84 (1913) 300; siehe auch Derselbe, Med. Klinik (1909) Nr. 41.

³⁾ Abderhalden, Die optische Methode und ihre Verwendung bei biologischen Fragestellungen, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 5 (1911) 575.

³⁾ Abderhalden u. Koelker, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51 (1907) 294.

Lösung von 0,6 g des Dipeptids in 7,6 ccm Hefepreßsaft und 0,4 ccm physiologischer Kochsalzlösung die folgenden Drehungsänderungen:

nach	5	Minuten	abgelesene	Drehung:	— 1,08°
"	12	"	"	"	— 0,85°
"	19	"	"	"	— 0,59°
"	26	"	"	"	— 0,23°
"	30	"	"	"	— 0,09°
"	35	"	"	"	+ 0,05°
"	40	"	"	"	+ 0,10°

Für die Untersuchung der tryptischen Spaltung ist das d-Alanyl-d-Alanin nicht geeignet, weil es von den Tryptasen zu langsam verändert wird. Das an seiner Stelle vorgeschlagene d-Alanyl-l-Leuzin wird kaum benutzt, da das l-Leuzin ein zu starkes Drehungsvermögen besitzt. Auch die Isolierung des Leuzins in Substanz durch sein Vermögen, aus konzentrierten wäßrigen Lösungen in kugeligen Kristallaggregaten auszufallen, würde sich für eine quantitative Gestaltung des Verfahrens wegen der zu großen Löslichkeit des Leuzins nicht eignen. Nur die von Sørensen ausgearbeitete Methode¹⁾ der Direkttitration der Aminosäuren könnte auch hier zum Ziele führen. Dagegen ist das Glyzyl-l-tyrosin ein auch für die Spaltproduktbestimmung in Substanz geeignetes Substrat. Hier gestattet in der Tat die Schwerlöslichkeit des aus dem Dipeptid in Freiheit gesetzten Tyrosins eine quantitative Bestimmung des peptidspaltenden Fermentes, wo nicht löslichkeitsbeeinflussende Faktoren eine nicht zu unterschätzende Fehlerquelle mit sich bringen.

Die quantitative Bestimmung auf diesem Wege erfolgt, wie schon auf S. 174 angedeutet wurde, durch Wägen des filtrierten, mit wenig Wasser, absolutem Alkohol und Aether ausgewaschenen und im Exsikkator getrockneten Tyrosinniederschlags einer im Brutschrank sich selbst überlassenen, mit Toluol überschichteten Mischung von z. B. 5 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit und 1 ccm einer 10%igen Glyzyl-l-tyrosin- oder Seidenpeptonlösung. Hat sich nach 2mal 24 Stunden noch kein Tyrosin ausgeschieden, so muß die Flüssigkeit angesäuert und eingeeengt werden. Fällt auch dann kein Tyrosin aus, so fehlt das peptidspaltende Ferment in der geprüften Flüssigkeit.

Um die störende Löslichkeitsbeeinflussung zu vermeiden, haben Abderhalden und Koelker (loc. cit.) vorgeschlagen, die zu untersuchende Lösung so weit zu verdünnen, daß sie ungefähr 1% Tyrosin

¹⁾ Siehe im vorigen S. 219.

enthält. Hierauf wird mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag abfiltriert, ausgewaschen und abgepreßt, im Filtrat die überschüssige Phosphorwolframsäure mit Baryt entfernt, der überschüssige Baryt mit der gerade hierzu notwendigen Schwefelsäuremenge ausgefällt, die Lösung eingeeengt und so das Tyrosin quantitativ zur Abscheidung gebracht. Der große Vorteil von Trypsinbestimmungen durch Polypeptidabbau gegenüber denjenigen, welche auf den Abbau von genuinem Eiweiß abstellen, liegt in dem einheitlichen, konstitutiv völlig aufgeklärten Verdauungsobjekt, dessen Aufspaltung von Anfang bis zu Ende völlig durchsichtig erscheint.

Eine andere Frage ist, inwieweit solche nur die letzte Phase der Tryptasewirkung berücksichtigende Verdauungsversuche für den ganzen Prozeß maßgebend sind. Es ist sehr wohl möglich, und die Versuche von Weis¹⁾ an Phytotrypsasen²⁾ stützen diese Ansicht, daß ein in der proteolytischen Phase sehr wirksames Trypsin in der peptischen nur geringen Einfluß besitzt und umgekehrt, dies umso mehr, als das Prinzip der Wirkung in den beiden Teilen der tryptischen Verdauung nicht identisch ist. Denn an Stelle der einfachen Auflösung der Polypeptidbindungen, welche dem zweiten Verdauungsstadium zufällt, liegt der ersten Phase ein andersartiger hydrolytischer, wenn nicht sogar — wie bei der Stärke — ein depolymerisierender Prozeß zugrunde, sonst würde die Wirksamkeit des nur auf das erste Stadium eingestellten Pepsins bei den Peptonen nicht auf eine unüberschreitbare Grenze stoßen. Solche Bedenken fallen doppelt schwer ins Gewicht, weil die Einheitlichkeit des Trypsins mehr als fraglich erscheint³⁾, ja weil sogar darüber gestritten wird, ob neben dem Trypsin im Pankreassaft noch eine zweite von Pollak⁴⁾ als Glutininase⁵⁾ bezeichnete säurebeständige Protease vorhanden ist.

¹⁾ Weis, Medd. fra Carlsberg Lab. 5 (1903) 127.

²⁾ Weis konnte die beiden Spaltungsphasen bis zu einem gewissen Grade voneinander trennen; die proteolytische Wirkung erfolgte viel rascher als die Weiterspaltung der Albumosen.

³⁾ Siehe über diese Frage: Oppenheimer, Die Fermente, 4. Aufl., Bd. I, Leipzig 1913, S. 352, 375, 389, 436—439, 442, 443. Herzog u. Kasarnowski, Zeitschr. f. Elektrochem. 13 (1907) 533; Biochem. Zeitschr. 11 (1908) 172, sprechen das Trypsin als Fermentgemisch an; vgl. ferner Abderhalden u. Koelker, loc. cit. S. 224, Fußnote 2.

⁴⁾ Pollak, Hofmeisters Beitr. 6 (1905) 95.

⁵⁾ Für die Annahme von Pollak haben sich Hattori, Arch. intern. Pharm. 18, 255; Biochem. Zentralbl. 8 (1909) 1014; Nicolle u. Pozerski, Ann. Inst. Pasteur 25 (1911) 336, ausgesprochen, dagegen Ehrenreich, Arch. Verdauung 11 (1905) 261; Ascoli u. Neppi, Zeitschr. f. physiol. Chem. 56 (1908) 135,

Richtiger ist es daher auf alle Fälle, sich bei Angaben über die tryptische Wirksamkeit eines gegebenen Untersuchungsmaterials, welche sich auf die an Polypeptiden gewonnenen Resultate stützen, auf die peptolytische Komponente zu beschränken. Die proteolytische könnte man dann dadurch indirekt eruieren, daß man gleiche Trypsinquantitäten auf die nämliche Menge einer der Polypeptidlösung äquimolekularen eines genuinen Eiweißkörpers einwirken läßt und nach derselben Zeit die Verdauung unterbricht. Von dem hieraus ermittelten Wert für die totale verdauende Kraft, deren Größe sich aus der in den beiden Teilphasen vorhandenen additiv zusammensetzt, würde man dann den Wert der an Hand der Polypeptidspaltung gefundenen peptolytischen Verdauung in Abzug bringen. Durch diese gegenseitige Ergänzung der auf die Messung der tryptischen Totalverdauung und der auf die Messung der peptolytischen Partialverdauung gerichteten Untersuchungsmethoden würde der Wert beider Verfahren erhöht und dadurch in theoretischer wie praktischer Hinsicht wichtige neue Einblicke in den vielgestaltigen Mechanismus der Wirkung tryptischer Fermente ermöglicht.

Gesetzmäßigkeiten bei der Wirkung von Tryptasen und Peptasen und deren Störungsquellen: Durch eine Auflösung der tryptischen Spaltung in ihre verschiedenen Phasen wird man auch eher dazu kommen, Klarheit über die Gesetze der Trypsinwirkung zu erlangen. Hier bleibt der Forschung noch vieles zu tun übrig. Denn in bezug auf die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration kann das Schützsche Gesetz der Proportionalität zwischen Verdauungsgeschwindigkeit und der Quadratwurzel aus der Fermentkonzentration nur für das Pepsin als den Tatsachen höchst wahrscheinlich entsprechend betrachtet werden.

Des weiteren hatte sich für das Pepsin die Beziehung ergeben, daß die Geschwindigkeit des Verdauungsprozesses der Menge der Umsetzungsprodukte umgekehrt proportional ist, da das Enzym durch diese letzteren gebunden und seinem Wirkungsfeld (gemäß der Menge der Umsetzungsprodukte) entzogen wird. Die Beziehung zur Substratkonzentration wird für ein ziemlich großes Intervall durch die Formel¹⁾:

$$kt = a \cdot \log \frac{a}{x} - (a - x)$$

dargestellt, welche Arrhenius²⁾, nach Versuchen von Bayliss³⁾, am Kasein-

¹⁾ Vgl. darüber das von Herzog dem Werk von Oppenheimer, Die Fermente, Bd. 2, Leipzig 1913, beigegebene Sonderkapitel über die Physikalische Chemie der Fermente und Fermentreaktionen, S. 996 ff.

²⁾ Arrhenius, Immunochemie, Leipzig 1907, S. 53,

³⁾ Bayliss, Archive Sciences Biol., Suppl. 11 (1904) 261.

natrium auch für die Trypsinspaltung gültig befunden hat. V. Henri u. Larguier des Bancel¹⁾, sind demgegenüber auf die Gleichung einer monomolekularen Reaktion gekommen. Bis zu 4%igen Kaseinlösungen erfolgte die Verdauungsgeschwindigkeit proportional der Substratkonzentration, in 4—8%igen Lösungen war sie von dieser letzteren unabhängig und in noch konzentrierteren Lösungen herrschte zwischen beiden Werten umgekehrte Proportionalität²⁾.

Das Erepsin folgt dagegen bei starker Enzymwirkung wenigstens während der ersten halben Stunde (wo sich der zunehmende Aktivitätsverlust des Enzyms noch nicht geltend macht) der monomolekularen Reaktionsgleichung. Von der Konzentration des zu spaltenden Glyzylglyzins ist die Reaktionsgeschwindigkeit in einem bestimmten Konzentrationsbereich unabhängig. Ist die Erepsinmenge gering, so nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Substratkonzentration zu (Euler³⁾). Durch Superposition der beiden Grenzkurven der Umsetzung: der Geraden:

$$k = \frac{x}{t}$$

und der logarithmischen:

$$k' = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x},$$

haben Abderhalden u. Michaelis⁴⁾ eine Kurve:

$$k'' = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x} + \varepsilon \frac{x}{t}$$

erhalten, die den ganzen Spaltungsverlauf darstellt.

Für das Trypsin⁵⁾ sind also, wie auch aus den früheren Ausführungen hervorgeht, die Verhältnisse alles andere eher als geklärt. Es erscheint dies begreiflich, wenn man bedenkt, daß sich die tryptische Spaltung des genuinen Eiweißes aus den beiden vorhin näher charakterisierten Phasen zusammensetzt, deren erstere wohl dem Quadratwurzelgesetz der Pepsinwirkung gehorcht, während die zweite der von Euler⁶⁾ sowie Abderhalden und Michaelis⁷⁾ für das Erepsin⁸⁾

¹⁾ V. Henri u. Larguier des Bancel, *Compt. rend.* 136 (1902) 1581; *Soc. Biol.* 55 (1903) 787, 789, 866.

²⁾ Ueber die Beziehung zwischen Temperatur und Substrathydrolyse siehe für Pepsin und Trypsin: Herzog; *Chemisches Geschehen im Organismus*, Habilitationsschrift, Karlsruhe 1905, S. 45; für Erepsin: Abderhalden, Caemmerer u. Pincussohn, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 59 (1909) 293.

³⁾ Euler, loc. cit. diese Seite, Fußnote 6).

⁴⁾ Abderhalden u. Michaelis, loc. cit. S. 224, Fußnote 3,

⁵⁾ Siehe außer der im vorigen angegebenen Literatur Herzog u. Kasarnowski, loc. cit. vorletzte Seite, Fußnote 3.

⁶⁾ Euler, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 51 (1907) 213; *Allg. Chemie d. Enzyme*, 1910, S. 137.

⁷⁾ Abderhalden u. Michaelis, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 52 (1907) 326.

⁸⁾ Wenigstens für den Beginn der Spaltung, wo die Reaktionsprodukte noch nicht wesentlich ihre infolge des Massenwirkungsgesetzes und infolge des Eingehens chemischer Bindungen mit dem Ferment störende Wirkung ausüben.

rscheinlich gemachten einfachen Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration Folge leistet ¹⁾).

Euler weist jedoch darauf hin, daß bei kleiner Erepsinkonzentration k schneller als diese letztere steigt und daß bei großen Konzentrationen Abweichungen im Sinne des Schützschens Gesetzes beobachtet werden können. Auch ben Abderhalden u. Koelker (l. c.) bei der Spaltung von d-Alanylglyzin reich Hefepreßsaft Proportionalität zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und r Quadratwurzel aus der Fermentmenge festgestellt.

Bei den Tryptasen dürften auch häufig Komplikationen des Reaktionsbildes durch beigemengte Fermente von reinem Peptasetypus zu berücksichtigen sein, deren Wirkung sich zu der Peptasekomponente der betreffenden Tryptase hinzuaddiert. Gerade für das Hauptuntersuchungsobjekt, das Pankreastrypsin, kommt dies in Betracht. In Pankreasextrakten finden sich wie in den Extrakten anderer Gewebe Peptasen²⁾. Dagegen war es fraglich, ob auch der Pankreassaft Peptasen enthält, was noch jüngst Lombroso³⁾ bestritten hat, d. h. ob es sich bei der von den verschiedensten Seiten beobachteten peptischen Wirkung des Pankreassaftes um die Mitwirkung besonderer Peptasen oder lediglich um die peptische Komponente des Trypsins handelte. Im letzteren Falle war zu erwarten: 1. daß sich der nicht aktivierte Pankreassaft gegen die polypeptidischen Spaltprodukte des genuinen Eiweiß ebenso indifferent verhält wie gegenüber dem genuinen Eiweiß selbst. 2. Daß sich Hemmungswirkungen durch dasselbe Agens gegenüber der peptischen wie gegenüber der proteolytischen Teilwirkung des Trypsins geltend machen müßten, und 3. daß eine Trennung der gegenüber den verschiedenen Substraten wirksamen Agentien nicht bewerkstelligt werden könnte. Die Versuche zeigten jedoch auf der ganzen Linie, daß ein solcher Parallelismus nicht besteht. Wie schon Bayliss und Starling⁴⁾ auf Grund der abbauenden Wirkung des nichtaktivierten Pankreassaftes gegenüber Fibrin und Kasein die Gegenwart pankreatischer Ereptase in solchem Saft angenommen hatten, so fanden später Schaeffer und Terroine⁵⁾, Zunz⁶⁾ und Wohlgemuth⁷⁾ starke abbauende Wirkungen von Polypeptiden am reinen,

¹⁾ Abderhalden u. Koelker, Zeitschr. f. physiol. Chem. 54 (1908) 363, 55 (1908) 416,

²⁾ Vernon, Journ. Physiol. 30 (1903) 330; Zeitschr. f. physiol. Chem. 50 (1906/07) 440; Mays, Ebenda 49 (1906) 124, 188.

³⁾ Lombroso, Arch. Fisiol. 10, 317; Biochem. Zentralbl. 14, 1273.

⁴⁾ Bayliss u. Starling, Journ. Physiol. 30 (1903) 61.

⁵⁾ Schaeffer u. Terroine, Journ. Physiol. Pathol. gén. 12 (1910) 884, 905.

⁶⁾ Zunz, Arch. intern. Physiol. 11 (1912) 191.

⁷⁾ Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 39 (1912) 302.

gegenüber nativen Eiweißkörpern inaktiven Pankreassekret. Ferner zeigten Glaeßner und Stauber¹⁾, sowie Wohlgemuth (loc. cit.), daß der Hemmungswirkung, welche Normalserum auf die proteolytische Wirkung des aktivierten Pankreassekretes ausübt, nicht nur keine Hemmungswirkung des Peptaseeffektes, sondern im Gegenteil eine Steigerung des letzteren (Wohlgemuth) gegenübersteht, und auch das spezifische Antiserum, welches Bergell und Schütze²⁾ durch Behandeln von Kaninchen mit Trypsin erhalten konnten, ist nicht imstande Peptasewirkungen zu hemmen.

Dagegen hemmen nach Abderhalden u. Gigon³⁾ sowie Caemmerer⁴⁾, alle natürlich vorkommenden, optisch aktiven Aminosäuren, wobei der Spaltproduktcharakter, wie die geringe Wirkung des Glykokolls zeigt, nicht so sehr in Betracht zu fallen scheint wie die optische Aktivität. Die optischen Isomeren der in den Eiweißkörpern enthaltenen Aminosäuren hemmen weit schwächer.

Noch schlagender spricht für die Existenz besonderer Peptasen im Pankreassekret die Möglichkeit ihrer Trennung vom Protrypsin des inaktiven Pankreassaftes durch Dialyse. Während das Protrypsin in das Dialysat wandert, bleibt das pankreatische Erepsin im inneren Gefäß des Dialysators zurück. Auch nach dem Zusatz der von Pawlow entdeckten aktivierenden Kinase⁵⁾ in Form von 1 ccm Darmsaft (aus einer Thiry-Vellaschen Fistel) zu 5 ccm Pankreassaft und $\frac{1}{2}$ —1stündigem Verweilen der Mischung bei Zimmertemperatur zeigt der dialysierte Pankreassaft daher keine proteolytischen Wirkungen gegenüber genuinem Eiweiß, sondern nur den auch im nicht aktivierten Zustand vorhandenen Peptaseeinfluß.

An Stelle von Darmsaft kann zur Aktivierung dieselbe Menge eines Extraktes aus der Darmschleimhaut eines mit Fleisch gefütterten Hundes⁶⁾ verwendet

¹⁾ Glaeßner u. Stauber, Biochem. Zeitschr. 25 (1910) 204.

²⁾ Bergell u. Schütze, Zeitschr. f. Hygiene 50 (1905) 305.

³⁾ Abderhalden u. Gigon, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53 (1907) 251.

⁴⁾ Caemmerer, Die Beeinflussung der Wirkung peptolytischer Fermente durch Zusatz verschiedener Aminosäuren, Inaug.-Dissert., Gießen 1911.

⁵⁾ Délézenne, Compt. rend. Soc. Biol. 59 (1905) 476; siehe ferner Derselbe, Ebenda in einer größeren Zahl von Arbeiten in den Bänden: 53 (1901); Délézenne u. Frouin, Ebenda 54 (1902) 691, 693; Délézenne, Ebenda 54 (1902) 590, 693, 55 (1903) 171, 56 (1904) 166; Compt. rend. 134 (1902) 1526; sowie Zunz, Recherches sur l'activation du suc pancréatique par les sels Bruxelles (1907) 108; Mémoires de l'Acad. Royal med. de Belges 20 (1909) 69; Biochem. Zentralbl. 9, 1656, aktivieren statt mit Kinase mit einer doppelt-molaren, also 22%igen Chlorkalziumlösung, indem sie den zu aktivierenden Pankreasfistelsaft mit dem zehnten Teil seines Volumens Chlorkalziumlösung vermischen und während einer Stunde sich selbst bei Zimmertemperatur überlassen.

⁶⁾ Siehe Frouin, Compt. rend. Soc. Biol. 58 (1905) 1025, 63 (1907) 473.

werden, das durch Zerreiben des abgeschabten gereinigten Darmes mit Quarzsand oder Glassplittern, Mazeration mit dem dreifachen Volumen 1 %iger Sodalösung während einer halben Stunde bei Zimmertemperatur, genaue Neutralisation mit verdünnter Essigsäure, Filtration, Nachwaschen des Rückstands mit wenig Essigsäure enthaltendem Wasser und Toluolzusatz zu den vereinigten Filtraten gewonnen wird. So erhaltene Extrakte, die unmittelbar vor der Verwendung mit Natriumkarbonatlösung bis zur beginnenden alkalischen Reaktion versetzt werden müssen, sind erepsinfrei und lange haltbar.

Eine weitere Frage ist, ob die Pankreaspeptase mit der gewöhnlichen Darmpeptase identifiziert werden kann, welche nach Falloise¹⁾ von den Darmzotten und den Lieberkühnschen Drüsen sezerniert wird. Dies scheint nicht oder doch nur teilweise der Fall zu sein, da das Sekret der Darmschleimhaut auch solche Polypeptide spaltet, welche die Peptasen des Pankreassaftes nicht anzugreifen vermögen, selbstverständlich innerhalb der für die Spaltungsfähigkeit der Polypeptide gezogenen Grenzen (siehe *Allg. Teil*, S. 512 u. 513). Bei der starken Beeinflussbarkeit der peptischen Wirksamkeit des Sekrets der Darmschleimhaut durch die Natur der aufgenommenen Nahrung dürfte es sich jedoch eher als um prinzipiell verschiedene Agenzien um eine spezifische Einstellung desselben peptischen Grundprinzips auf diejenigen unvollständig gespaltenen Komplexe handeln, die in dem betreffenden Darmabschnitt am häufigsten als Reiz für die Peptasebildung und Sekretion in Betracht kommen. Fehlt der Reiz bei längerem Hungern, so reduziert sich nach Bottazzi (*loc. cit.*) auch das Polypeptidspaltungsvermögen des Darmes auf ein Minimum.

Kompliziert werden die Beziehungen wohl auch durch den Einfluß, den das Alkali auf die Geschwindigkeit des Reaktionsverlaufes ausübt. Zeigt doch schon die einfache Dipeptidspaltung durch Erepsin die weitgehendste Abhängigkeit von der Alkalinität der Lösung, eine Abhängigkeit, die Euler²⁾ zu dem Schluß veranlaßt hat, daß nur das Alkalisalz des Peptids gespalten werde.

Auch bei manchen Salzwirkungen auf Peptasen, wo von Abderhalden und seinen Mitarbeitern entgegengesetzte Resultate erhalten wurden, je nach der Salzkonzentration und der Natur des Substrates mag, wie beim Zyankalium, eine Alkaleszenz der Salzlösungen mit im Spiele sein. Beschleunigend in jedem Fall wirkte Chlorkalzium, während die Chloride des Natriums, Strontiums und Magnesiums wirkungslos waren. Fluornatrium beschleunigt die Glyzyl-l-tyrosinspaltung, während es die Spaltung des d-l-Leuzyglyzins hemmt.

¹⁾ Falloise, Arch. intern. Physiol. 2 (1904) 299.

²⁾ Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2 (1907) Nr. 39; zitiert nach Euler, Allg. Chem. d. Enzyme, *loc. cit.* S. 136.

Johanne Christiansen¹⁾ hat auf titrimetrischem Wege festgestellt, daß sich bei der totalen Eiweißspaltung unter der kombinierten Wirkung von Trypsin und Erepsin zunächst saure Abbauprodukte bilden, daß sich aber mit der Zunahme der Aminosäuren die Reaktion mehr und mehr dem Neutralitätspunkt nähert, welcher nahezu dem Optimum für die Peptasewirkung entspricht. Jedenfalls wirken nur ganz schwache Hydroxylionenkonzentrationen — nach Euler²⁾ $1,2 \cdot 10^{-5}$ (bzw. $H^+ = 2 \cdot 10^{-9}$), bei Pankreassaft $2 \cdot 10^{-8}$ — wie sie nach Raubitschek³⁾ in 0,06%igen Sodalösungen vorliegen, begünstigend auf die Peptonspaltung⁴⁾. Dies gilt jedoch weder für pflanzliche Peptasen, für welche Vines⁵⁾ eine Kombination mit in saurer Lösung wirksamen Pepsinasen wahrscheinlich gemacht hat, noch für die „ β -Proteasen“ der Organe, die nach Takemura⁶⁾ gerade in schwach saurer Lösung ihre optimale, allerdings unter dem Trypsin- und Erepseffekt liegende Wirkung gegenüber Protaminen, z. B. dem Clupein⁷⁾ zeigen.

Inwieweit die bei einem bestimmten pepsin-trypsin- oder erepsinartigen Ferment gefundenen Gesetzmäßigkeiten auch für die anderen der gleichen Art Gültigkeit besitzen, kann noch nicht entschieden werden, doch spricht das vorliegende Material eher für die Berechtigung von Analogieschlüssen als dagegen. Wenigstens konnte Weis (loc. cit.) für Pflanzenproteasen (deren bestbekannter Vertreter das Papayotin ist) die Gültigkeit der Schützschens Regel wahrscheinlich machen und für die Peptase des Hefepreßsaftes wiesen Abderhalden und Brahm⁸⁾ ein dem Erepsin des Darmsaftes⁹⁾ sehr ähnliches Verhalten nach.

¹⁾ Johanne Christiansen, Biochem. Zeitschr. 46 (1912) 71.

²⁾ Euler, loc. cit. vorige Seite, Fußnote 2.

³⁾ Raubitschek, Zeitschr. f. experim. Pathol. 4 (1907) 674.

⁴⁾ Siehe ferner Mathieu, Compt. rend. Soc. Biol. 68 (1910) 1083.

⁵⁾ Vines, Ann. Bot. 18 (1904) 289, 20 (1906) 113, 22 (1908) 103, 23 (1909) 1, 24 (1910) 213.

⁶⁾ Takemura, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63 (1909) 201.

⁷⁾ Rogozinski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 79 (1912) 398.

⁸⁾ Abderhalden u. Brahm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 57 (1908) 342.

⁹⁾ Ueber das Peptone spaltende Ferment des Darmsaftes (Erepsin) siehe Capparelli, Atti Accad. Sc. nat. Catania [7] 12 (1899); Biochem. Zeitschr. 38 126; Cohnheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. 33 (1901) 451, 35 (1902) 134, 36 (1902) 13, 47 (1906) 286, 49 (1906) 64, 51 (1907) 415, 52 (1907) 526; Kutscher u. Seemann, Ebenda 34, 530, 35 (1902) 432; Salaskin, Ebenda 35 (1902) 419; Hamburger u. Hekma, Journ. Physiol. Pathol. gén. 4 (1902) 805; Lambert, Compt. rend. Soc. Biol. 55 (1903) 416; Weinland, Zeitschr. f. Biol. 45 (1904) 293; Nakayama, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41 (1904) 348; Falloise, Arch. intern. Physiol. 1 (1904) 261, 2 (1905) 299, 3 (1906) 282; Weekers, Ebenda 2 (1905) 49; Vernon, Journ. Physiol. 32, 33, 33 (1905) 81; Intracellular En-

ethoden, die der Ermittlung der Peptasen im bere dienen: Für das Erepsin und verwandte peptolytische te bestehen noch einige Bestimmungsmethoden, die sich für mittlung der peptischen Komponente der Tryptasen weniger nen. Es kann vorkommen, daß sich eine peptolytische Wir- ur gegenüber bestimmten besonders leicht angreifbaren Peptiden am Glyzyl-l-tryptophan — äußert, während Glyzyl-l-tyrosin nicht en wird. Dagegen schließt eine Spaltungsfähigkeit gegenüber hwerer angreifbaren Glyzyl-l-tyrosin zugleich eine Spaltungs- sit gegenüber dem l-Glyzyl-Tryptophan ein. Die Spaltung des en Substrates wird zunächst qualitativ geprüft an einer etwa der auf einen Peptasegehalt zu untersuchenden Flüssigkeit, n 10%iger Glyzyl-l-tryptophanlösung (oder des Fermentdiagnosti- von Kalle und Co., Biebrich a. Rh.), und ungefähr 1 ccm Toluol tenden, 24 Stunden im Brutschrank verbliebenen Mischung. ccm der letzteren werden mit etwas 3%iger Essigsäure versetzt nit wenig Bromdampf vorsichtig unter Schütteln vermischt. Je der Menge des durch die Peptase in Freiheit gesetzten Trypto- färbt sich hierbei die Flüssigkeit rosenrot bis dunkelviolet, sgesetzt, daß kein die Färbung zerstörender Bromüberschuß zu- t ist.

Für die quantitative Bestimmung wird eine Serie von Reagenz- rn mit von 2 ccm an absteigenden Quantitäten der zu prüfenden igkeit beschickt. Hierauf erhält jede Verdünnung denselben Zu- von 0,5 ccm einer 5%igen Glyzyl-l-tryptophanlösung und etwas ol, und wird für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Dann gt die vorsichtige Prüfung mittels Brom wie bei der qualitativen e. Das Gläschen, welches gerade noch eine rosenrote Färbung t, stellt die Grenzverdünnung dar, aus der sich in der üblichen ise der Fermentgehalt berechnet. Es können aber auch die Zeiten chen Umsatzes — d. h. einer eben wahrnehmbaren Bromreaktion

es, London 1908; Bottazzi, Arch. Fisiol. 5, 317; Hamburger, Akad. van enschap. Amsterdam 17 (1907) 191; Bergmann, Skandin. Arch. Physiol. 18 (6) 119; Jaeggy, Zentralbl. f. Gynäkol. (1907) 1060; Langstein u. Sol- 1, Jahrb. f. Kinderheilk. 67 (1908) 9; Foà, Arch. Fisiol. 5 (1908) 1; siehe er die grundlegenden Arbeiten von Abderhalden u. Teruuchi, Zeitschr. hysiol. Chem. 49 (1906) 1; Abderhalden, London u. Voegtlin, Ebenda (1907) 334; und für das Erepsin im Darm von Wirbellosen (Würmern, Arthro- len, Mollusken und Coelenteraten) Abderhalden u. Heise, Ebenda 63 (9) 136; Abderhalden, Ebenda 74 (1911) 409; s. ferner Hedin u. Masai, enda 100 (1917) 263; Hedin 104 (1918) 11; 112 (1921) 252.

in den verschiedenen Gläschen — miteinander verglichen werden, eine Modifikation, die den Vorteil einer ständigen Kontrollierung der Reaktionsgemische und damit einer viel genaueren Verfolgung des Reaktionsverlaufes in sich schließt als die Methode des Farbenvergleichs nach der willkürlich gewählten Digestionszeit von 24 Stunden.

Während hier und bei den vorausgeschickten Verfahren der Peptase- und Tryptaseermittlung auf die charakteristische Reaktion eines Spaltproduktes abgestellt wurde, handelt es sich in anderen Fällen um den Nachweis des Verschwindens einer typischen Reaktion des Ausgangsmaterials. Eine solche ist bei den meisten Polypeptiden und allen natürlichen, nicht über die Peptonstufe hinausgegangenen, Abbauprodukten des genuinen Eiweiß die Biuretreaktion. Dieselbe ist von Cohnheim¹⁾ für die Peptaseermittlung herangezogen worden. Zu dem Zweck stellt man aus dem käuflichen Amphopepton (Kühne) eine 1%ige wäßrige Lösung dar, oder gewinnt eine geeignete die Biuretreaktion mit rein roter Farbe gebende Peptonlösung, durch Verdauung von Muskeleiweißpulver, das aus fein gehacktem, von Fett und Sehnen befreiten, 2 Tage mit chloroform- und toluolhaltigem warmem Wasser digerierten Rindfleisch, nach dem Abpressen und mehrmaligen Behandeln des Rückstands mit Alkohol und Aether gewonnen wird. Die Verdauung des Eiweißpulvers erfolgt in der Weise, daß 100 g desselben mit 2 Liter 2%iger Oxalsäurelösung und 6 g Pepsin puriss. Grübler geschüttelt und danach erst eine Woche im Brutschrank, dann 2 Wochen bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen werden. Hierauf wird die Flüssigkeit abfiltriert, die Oxalsäure durch Kreidepulver entfernt, wiederum filtriert, das Filtrat auf 300 ccm eingeeengt und, wenn notwendig, nochmals filtriert. Je 2 bis 4 ccm dieser Flüssigkeit oder der erwähnten Amphopeptonlösung werden dann in 2 mit 5 bis 10 ccm Darmsaft (oder einer anderen auf Peptase zu prüfenden Flüssigkeit) beschickte Reagenzgläschen gebracht²⁾, die eine Probe aufgekocht und nach Toluolzusatz zu beiden Gläschen dieselben während 24 oder eventuell auch 48 Stunden gut verschlossen im Brutschrank belassen. Danach werden je 2 ccm beider Proben mit wenig Essigsäure und konzentrierter Kochsalzlösung aufgekocht, von gefällttem Eiweiß abfiltriert und die beiden Filtrate mittels der Biuretreaktion in genau gleicher Weise geprüft³⁾. Eine Schwächung oder ein Ausbleiben der Biuretreaktion in der ungekochten

¹⁾ Cohnheim, Zeitschr. f. physiol. Chem., 33 (1911) 453.

²⁾ Die Mengen richten sich nach der zu erwartenden peptischen Aktivität.

³⁾ Siehe hierzu den Abschnitt über die Abwehrfermente.

Probe gegenüber dem positiven Ausfall der Reaktion in der gekochten Probe beweist die Gegenwart von Erepsin oder einer verwandten Peptase, und es kann dann die genaue Bestimmung in der folgenden Weise ausgeführt werden¹⁾:

Ein erstes Reagenzgläschen erhält einen Zusatz von 2 ccm der peptasehaltigen Flüssigkeit, ein zweites 1,5 ccm, ein drittes 1 ccm und von da an vier weitere Gläschen sukzessive 0,2 ccm weniger. Das achte Gläschen wird mit 0,1 ccm Fermentlösung beschickt. Danach werden demselben 0,9 ccm physiologische Kochsalzlösung oder destilliertes Wasser, und den folgenden vier Gläschen soviel derselben Verdünnungsflüssigkeit zugesetzt, daß das Flüssigkeitsvolumen in denselben ebenfalls gerade 1 ccm beträgt. Dann werden allen acht Proben je 0,5 ccm der Peptonlösung und Toluol zugefügt und dieselben gut verschlossen auf 24 Stunden in den Brutschrank verbracht. Nach eventuell vorausgegangenem Enteiweißen durch Kochen mittels wenig 10%iger Essigsäure unter Zusatz von etwas festem Kochsalz und Filtration wird an allen Proben die Biuretreaktion mit 20%iger Natronlauge und 1%iger Kupfersulfatlösung ausgeführt und die Gläschen festgestellt, welche eine noch eben wahrnehmbare Rotfärbung und gerade eben ein Ausbleiben derselben zeigen. Aus der Grenzverdünnung ergibt sich die Anzahl Erepsineinheiten, d. h. die Fermentmenge, welche gerade hinreicht, um 0,5 ccm der Peptonlösung in 24 Stunden in abiurete Stoffe umzuwandeln, in derselben Weise wie dies bei den entsprechenden Serienversuchen zur Ermittlung der Diastase auf Grund der Jodreaktion der Stärkeabbauprodukte angegeben worden ist.

An Stelle der Biuretreaktion hat sich Salaskin²⁾ der Phosphorwolframsäurefällung zur Erepsinermittlung vor allem in schwach wirksamen Fermentlösungen bedient. 10 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit werden mit 40 ccm Peptonlösung gemischt, die Mischung in zwei Hälften geteilt, von denen die eine aufgekocht wird und als Kontrolle dient. Beide Proben werden nach Toluolzusatz 2mal 24 Stunden im Brutschrank gehalten, worauf in denselben einerseits der Stickstoffgehalt des koagulablen Eiweißes und der Stickstoffgehalt des Filtrates, anderseits der Stickstoffgehalt der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stoffe und der Stickstoffgehalt des Filtrates der Phosphorwolframsäurefällung ermittelt wird. Eine Zunahme des Stickstoff-

¹⁾ Vgl. Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 39 (1912) 302; Grundriß der Fermentmethoden, Berlin 1913, S. 202.

²⁾ Salaskin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 35 (1902) 419.

gehaltes des letztgenannten Filtrates und eine Abnahme des Stickstoffgehaltes der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen zeigt die Gegenwart von Erepsin an und der Grad der Verschiebung entspricht dem Gehalt an dieser Peptase.

Die Ermittlung von Pflanzenproteasen: Was die Ermittlungsverfahren pflanzlicher Proteasen betrifft, auf welche schon hier und dort hingewiesen wurde, so schließen sich dieselben unter Einhaltung der optimalen Wasserstoffionen- bzw. Hydroxylionenkonzentration, unter denen sich die Wirkung irgend einer Pflanzenprotease in der Natur vollzieht, ganz den entsprechenden Pepsinase-, Tryptase- und Peptaseermittlungsmethoden für die Säfte und Extrakte tierischer Herkunft an. So wird die Endotryptase der Hefe, die ihr Optimum bei 2%oigem Salzsäuregehalt besitzt, entsprechend dem Vorschlag von Buchner¹⁾ nach der Methode von Fermi (loc. cit.) mittels Chloroformgelatine bestimmt. Diese letztere wird ebenfalls für die Ermittlung der proteolytischen Komponente der „Takadiastase“, jedoch bei alkalischer Reaktion, neben der Grütznerschen Fibrinflockenmethode und derjenigen von Groß und Fuld mittels Kasein häufig verwendet²⁾. Für das Papayotin oder Papain, das sich im Milchsaft sowie in den Früchten und Blättern von *Carica papaya* (Melonenbaum) findet, dient die Biuretreaktion als Erkennungsmittel. Dabei muß jedoch das ganz eigenartige hohe Temperaturoptimum der Papayotinwirkung berücksichtigt werden. Bei Brutschranktemperatur findet nicht nur keine Verdauung der Eiweißlösung statt, sondern es wird auch die Wirkung nachträglicher Erhitzung durch die Vorbehandlung bei niedriger Temperatur verunmöglicht³⁾. Für den Nachweis ist daher ein rasches Aufkochen, rasches Filtrieren vom ausgeschiedenen Koagulum und sofortiges Anstellen der Biuretreaktion am Filtrat unerlässlich. Man verfährt dabei in der Weise, daß man z. B. 5 ccm einer 2%oigen Papayotinlösung mit der zehnfachen Menge eines auf das Dreifache verdünnten Blutserums oder einer Eialbuminlösung vermischt, mit zwei Tropfen Essigsäure ansäuert⁴⁾ und auf 100° erhitzt. Das unverdaute Eiweißkoagulum wird abfiltriert und

¹⁾ Buchner u. R. Hoffmann, *Biochem. Zeitschr.* 4 (1907) 217; Buchner u. Klatte, *Ebenda* 9 (1907) 436.

²⁾ Wohlgemuth, *Biochem. Zeitschr.* 39 (1912) 324; Wohlgemuth u. Szanto, *Ebenda* 43 (1912) 31.

³⁾ Délézenne, Mouton u. Pozerski, *Compt. rend. Soc. Biol.* 142 (1906) 177; Jonescu, *Biochem. Zeitschr.* 2 (1907) 177.

⁴⁾ Nach anderen Angaben soll sich beim Papayotin schwache alkalische oder neutrale Reaktion ebenso bewähren wie schwach saure.

die Biuretreaktion in der üblichen Weise angestellt, wobei sich die Gegenwart von Peptonen durch die Rotfärbung des Reaktionsgemisches geltend macht. Auch kann das Filtrat mit Ammoniumsulfat oder Zinksulfat auf das Ausbleiben einer Eiweißfällung geprüft werden.

Autolytische Methoden.

Die Anwendung der Autolyse zum Nachweis und zur Gewinnung pflanzlicher Proteasen: Während bei den erwähnten Fermenten die spaltende Wirkung fremden Eiweißsubstraten gegenüber geprüft wird, ist bei den Proteasen gekeimter und ungekeimter Samen die Aufspaltung des Sameneiweißes selbst untersucht worden. So ermitteln Aron und Klempin¹⁾ den Proteasegehalt von Hafer aus der Differenz des löslichen Stickstoffes zweier Proben von je 30 g Hafer. Die eine Probe wird, mit 300 ccm Wasser versetzt, im Brutschrank während einer bestimmten Anzahl Stunden sich selbst überlassen, dann aufgekocht und der lösliche Stickstoff bestimmt. Die Kontrollprobe dagegen wird mit derselben Wassermenge (300 ccm) zunächst aufgekocht, dann ebenso lange wie die Hauptprobe in den Brutschrank gestellt, wiederum gekocht und der lösliche Stickstoff ermittelt. Da derselbe dem von vornherein vorhandenen löslichen Stickstoff entspricht, so ergibt die Differenz des bei der Kontrolle erhaltenen Wertes und des beim Hauptversuch erhaltenen, den unter dem Einfluß der Protease aus dem Sameneiweiß in Lösung gegangenen Stickstoff.

Ein wirksames und einige Wochen haltbares Präparat der Protease kann nach den genannten Forschern durch Zermahlen gleicher Teile von geschrotetem Hafer und Glyzerin in einer Kugelmühle während 10—12 Stunden, Abpressen des Rückstandes in einer Filterpresse, Abhebern des durch Sedimentation geklärten Filtrates und mehrmalige Filtration des Glyzerinextraktes gewonnen werden.

Das Verfahren der Glyzerinextraktion ist auch für die Herstellung wirksamer und haltbarer Proteasepräparate aus keimenden Samen verwendet worden²⁾. Zu diesem Zweck werden 300 g der gepulverten Cotyledonen von, bei 35—40° getrockneten, 6tägigen Keimlingen von *Lupinus luteus* mit einer Mischung von 500 ccm Glyzerin und 300 ccm Wasser versetzt und nach gutem Mischen 48 Stunden sich selbst überlassen. Hierauf wird das Extrakt erst durch ein Koliertuch gepreßt, dann filtriert und das klare Filtrat in ca. 3 Liter 95%igen Alkohol eingerührt. Nach einer Stunde wird die Flüssigkeit vom entstandenen Niederschlag dekantiert,

¹⁾ Aron u. Klempin, Biochem. Zeitschr. 9 (1908) 163.

²⁾ Butkewitsch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 32 (1901) 1.

erst mit 95%oigem, dann mit absolutem Alkohol und Aether gewaschen und im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

Prinzipiell analog ist die Methode, deren sich Grimmer¹⁾ zur Ermittlung der Protease von Hafer, Gerste und anderen Zerealien und sonstigen Futtermitteln bedient. Er überläßt je 100 g des Untersuchungsmaterials mit 1 Liter 2%oiger Salzsäure — resp. bei Proteasen, die besser bei alkalischer und neutraler Reaktion wirken, mit 2%oiger Sodalösung oder Wasser — während 6, 12 und 24 Stunden der Selbstverdauung im Brutschrank von 37°. Hierauf wird koliert, filtriert, das Filtrat zu 1½ Liter aufgefüllt und an 25 ccm desselben eine Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl ausgeführt. In einer zweiten Probe von 50 ccm des Filtrates werden Eiweiß und Syntonin durch Kochen unter Essigsäurezusatz ausgefällt, vom Koagulum abfiltriert, und am Filtrat wiederum eine Stickstoffbestimmung ausgeführt, welche den unkoagulablen stickstoffhaltigen Substanzen entspricht. Der Albumosenstickstoff wird ebenfalls von Grimmer ermittelt und zwar nach dem Wegschaffen des koagulierbaren Eiweißes durch Einengen von 1 Liter Filtrat auf 200 ccm und Ausfällung der Albumosen in schwefelsaurer Lösung nach der Methode von Zunz²⁾ mittels Zinksulfat. Vom Filtrat wird eine Portion direkt zur Stickstoffbestimmung benutzt, während eine andere Portion desselben Filtrates mit Phosphorwolframsäure versetzt wird. Am erhaltenen Niederschlag wird dann gleichfalls der Stickstoffgehalt bestimmt. Schließlich wird noch der präformierte lösliche Stickstoff des Untersuchungsmaterials ermittelt, indem 100 g mit eiskaltem Wasser übergossen 10 Minuten sich selbst überlassen bleiben. Dann wird im Eisschrank filtriert, am Filtrat der Stickstoff bestimmt, und von dem bei dem Selbstverdauungsversuch erhaltenen Wert in Abzug gebracht. Die Differenz entspricht der Proteasewirkung. Auch für gekeimte Samen hat sich nach Butkewitsch³⁾ ein den erwähnten ähnliches autolytisches Verfahren bewährt, bei welchem die getrockneten, zu einem feinen Pulver zerriebenen Keimlinge mit Aether extrahiert und danach mit Wasser versetzt für einige Zeit in den Brutschrank gestellt werden. Hierauf ermittelt man den bei der Selbstverdauung in Lösung gegangenen Stickstoff, den durch Phosphorwolframsäure fällbaren und den leicht als Ammoniak abspaltbaren Stickstoff.

¹⁾ Grimmer, Biochem. Zeitschr. 4 (1907) 80.

²⁾ Zunz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27 (1899) 219.

³⁾ Butkewitsch, loc. cit. vorige S., Fußnote 2; siehe ferner E. Schulze, Zeitschr. f. physiol. Chem. (1898) 18, 30 (1900) 24

Die Ermittlung der Autolyse tierischer Organe: Die soeben erwähnten und verwandte autolytische Methoden, bei denen für die Proteasebestimmung als Substrat organeigenes Eiweiß benutzt wird, sind ganz allgemeiner Anwendung fähig.

Physiologisch wichtiger als die Wirkung gegenüber fremden Substraten ist die Wirkung der proteolytischen Organ- und Zellfermente gegenüber dem organ- und zelleigenen Eiweiß, handelt es sich doch hier um jene Proteasen, denen normalerweise sowohl Abbau und Umbau des Gewebeseiweißes, wie auch dessen Aufbau aus den im Magendarmkanal gebildeten Bruchstücken des Nahrungseiweißes, nach dem Massenwirkungsgesetz zukommt, eine Wirkung, die sich nach dem Tode, wo eine Regeneration durch Umbau und Synthese nicht mehr in Frage kommt, einzig als eine Auflösung der Eiweißbestände usw. darstellt.

Die Autolyse bedarf jedoch nach dem eingetretenen Zelltod erst einer gewissen Zeit zu ihrem Einsetzen und zu ihrer Entwicklung, welche letztere nach Bostock¹⁾, zweimal 24 Stunden bis zum Erreichen des Maximums braucht, parallellgehend der Abnahme der Resistenz, welche lebendes Eiweiß auszeichnet²⁾. Die Latenzperiode, in der sich die beginnenden Spaltungsveränderungen nur durch die empfindlichen physiko-chemischen Methoden (die Leitfähigkeitsbestimmung und die gerade in den ersten 7—9 Stunden³⁾ am raschesten zunehmende Gefrierpunktserniedrigung⁴⁾ verraten, verläuft rascher oder langsamer, je nach dem Vorhandensein oder Fehlen besonderer zellschädigender Faktoren, z. B. narkotisch wirkender nach Chiari, loc. cit., oder osmotisch wirkender nach Launoy,⁵⁾ oder säurebildender Stoffe, wie der Fette nach Jackson⁶⁾.

Störungen, welche die Gewebsfermente betreffen, müssen nach dem Vorausgeschickten zu schwersten Schädigungen des Zellstoffwechsels führen und ihre Ermittlung hat somit auch pathologischen Wert. Bisher sind in dieser Richtung Hungerveränderungen⁷⁾ an verschiedenen Objekten, die karzinomatöse Leber⁸⁾, die Organe bei akuter gelber

¹⁾ Bostock, Biochem. Journ. 6 (1912) 388.

²⁾ Siehe Chiari, Archiv f. experim. Pathol. 60 (1909) 256.

³⁾ Delrez, Arch. internat. Physiol. 1, 159.

⁴⁾ Benson u. Wells, Journ. Biol. Chem. 8 (1910) 61; Liagre, Arch. internat. Physiol. 1, 172.

⁵⁾ Launoy, Ann. Inst. Pasteur 23 (1909) 1, 979.

⁶⁾ Jackson, Journ. experim. Med. 11 (1909) 55.

⁷⁾ Ueber gesteigerte Autolyse im Hunger siehe Lane-Clayton u. Schryver, Journ. Physiol. 31 (1904) 169; über Hungerveränderungen an Einzelligen vgl. Kasanzeff, Inaug.-Dissert., Zürich 1901; Adrienne Köhler, Untersuch. an Kolpoden, Inaug.-Dissert. Aus dem Inst. f. physik.-chem. Biol. d. Universität Bern, 1917; Zeitschr. f. allg. Physiol. 17 (1917) 287—386.

⁸⁾ Yoshimoto, Biochem. Zeitschr. 22 (1909) 302.

Leberatrophie¹⁾, die Phosphorleber²⁾, die Leber bei Basedow und Myxödem³⁾, die Leber bei Nekrose nach Chloroformvergiftung⁴⁾, die pneumonische Lunge⁵⁾ Gegenstand von Untersuchungen geworden, die ausgenommen beim Myxödem und bei der um ein Drittel herabgesetzten Leberautolyse⁶⁾ im Fieber⁷⁾ übereinstimmend eine Vermehrung der Autolyse ergaben, was sich bei Karzinom insbesondere durch eine Vermehrung des Pepton-, Diaminosäuren- und Ammoniakstickstoffs äußert.

Bei Pneumonie spielen auch die Leukozyten für die Fibrinolyse⁸⁾ eine große Rolle, aber darüber hinaus dürften gerade die so überaus kräftig wirken-

¹⁾ Taylor, Journ. med. Research 8 (1902); Zeitschr. f. physiol. Chem. 34 (1902) 580; Neuberg u. Richter, Deutsche med. Wochenschr. (1904) 499; Wells, Journ. experim. Med. 9 (1907) 627.

²⁾ Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30 (1900) 174; Soetbeer u. Jacoby, Archiv f. experim. Pathol. 50 (1903) 294; Kossel, Berliner klin. Wochenschrift (1904) 1065; Wakeman, Journ. experim. Med. 7 (1905) 292; Waldvogel, Archiv f. klin. Medizin 82 (1905) 437; Wohlgemuth, Biochem. Zeitschrift 1 (1906) 161; Porges u. Przibram, Archiv f. experim. Pathol. 59 (1908) 20.

³⁾ Da Schryver u. G. Bayer, Sitzungsber. d. Wiener Akad. [3] 118 (1909) 181; Journ. Physiol. 32 (1905) 159, im Gegensatz zu negativen Versuchen in vitro s. Wells, Amer. Journ. Physiol. 11 (1904) 351; Wells u. Benson, Journ. Biol. Chem. 3 (1907) 35; Kottmann, Zeitschr. f. klin. Medizin 71 (1910) 369, durch Schilddrüsenfütterung eine Steigerung der Leberautolyse bis zu einem Optimum, über welches die Zeitangaben variieren, erzielen konnten, so war der Befund zu erwarten, daß der mit Hypersekretion der Thyreoidea einhergehende Basedow mit Vermehrung, das durch Hyposekretion bedingte Myxödem dagegen mit Verminderung der Leberautolyse verknüpft ist.

⁴⁾ Wells, Journ. Biol. Chem. 5 (1908) 129; Kaschiwabara, Zeitschr. f. physiol. Chem. 80 (1912) 45. Ueber sonstige Steigerungen und Hemmungen der Autolyse in vivo und in vitro siehe Vandeveld, Biochem. Zeitschr. 3 (1907) 315 (Jodoform); Jacoby, Ebenda 9 (1908) 522; Laqueur, Brünecke u. Crampe, Zeitschr. f. physiol. Chem. 79 (1912) 38 (Salizylsäure); Laqueur u. Brünecke, Ebenda 79 (1912) 65 (Benzoesäure); Laqueur, Archiv f. experim. Pathol. 55 (1906) 240 (Chinin).

⁵⁾ Fr. Müller, Verhandl. d. naturforsch. Gesellsch. Basel 13, 308; 20. Kongreß f. inn. Medizin, Wiesbaden 1902; Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chem. 33 (1901) 126; Wohlgemuth, Berliner klin. Wochenschr. (1904) 704; Boehm, Archiv f. klin. Medizin 98 (1910) 583.

⁶⁾ Dagegen ist die Muskelaulyse im Fieber erhöht. Ein Gegensatz zwischen Muskel und Leber bei der Autolyse, allerdings in entgegengesetztem Sinn, zeigt sich auch bei Vergiftungen mit Blausäure und Salzsäure, wo Glikin u. Loewy, Biochem. Zeitschr. 10 (1908) 498, die Autolyse der Muskeln herabgesetzt fanden, nicht dagegen diejenige der Leber.

⁷⁾ Aronsohn u. Blumenthal, Zeitschr. f. klin. Medizin 65 (1908) 1.

⁸⁾ Ueber die Fibrinolyse bei Pneumonie siehe Filehne, Sitzungsber. d. Erlanger Phys. med. Soc. (1877) 169; Escherich, Archiv f. klin. Medizin 37

den Leukozytenproteasen¹⁾, die nach der Selbstverdauung ihres Trägers, der Leukozyten, frei werden, immunitätswissenschaftlich von grundlegender Bedeutung sein.

In dieser Hinsicht ist der Befund von Capelli u. Cristoforetti²⁾, interessant, wonach zwischen Leukozyten und Fermentwirkung des Blutes bei einer Reihe von Krankheiten Parallelismus besteht. Vor allem bemerkenswert ist aber der von Abderhalden vermutete leukozytäre Ursprung der Abwehrfermente und das Vorhandensein „leukozytärer Bakteriozidine“³⁾.

Handelt es sich um die Autolyse irgend eines Organs, so geht man zu deren Ermittlung nach Salkowski⁴⁾, welchem die bahnbrechendsten Arbeiten auf diesem Gebiete zu verdanken sind, in der Weise vor, daß das von Blut gereinigte, in der Fleischhackmaschine zu Brei zermahlene, mit Chloroform⁵⁾ und Toluol kräftig geschüttelte Organ bei Brutschranktemperatur stehen gelassen wird. Danach kann man entweder nur am Filtrat des durch Kochen mit Monokaliumphosphat erhaltenen Koagulums den in Lösung gegangenen Stickstoff in toto ermitteln, oder man kann eine Differenzierung des durch Autolyse in Lösung gegangenen Stickstoffs durch Ermittlung des Monoamino-säuren-, Albumosen- und Purinbasenstickstoffs durchführen. Im ersteren Fall empfiehlt es sich, 50 g Organbrei nach gründlichem Schütteln mit $\frac{1}{2}$ Liter gesättigtem Chloroformwasser⁶⁾ 24 Stunden bei 37° der Autolyse zu überlassen, dann 100 ccm der über dem abgesetzten Organbrei befindlichen klaren Flüssigkeit abzapipettieren, in einem Becherglas durch Kochen mit 1 g Monokaliumphosphat das Eiweiß abzuscheiden, abzufiltrieren, mit Wasser nachzuwaschen, das abgekühlte Filtrat auf 100 ccm aufzufüllen und in 20 ccm desselben den

(1885) 196; Simon, Ebenda 70 (1901) 604; Silvestrini, Boll. Soc. Eustachiana (1903); Biochem. Zentralbl. 1, 1599; Rulot, Arch. intern. Physiol. 1 (1904) 152; Müller u. Kolaczek, Münchener med. Wochenschr. (1907) 354; Bittorf, Archiv f. klin. Medizin 91 (1907) 212.

¹⁾ Siehe Literatur bei Leukozytenfermenten.

²⁾ Capelli u. Cristoforetti, Fol. Clinica microscop. 2, 12; Zentralbl. f. Biochem. 11, 3144.

³⁾ Siehe im folgenden in den betreffenden Kapiteln.

⁴⁾ Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63 (1909) 136; Zeitschr. f. klin. Medizin 17, Suppl.-Bd., 79 (1891); d. Deutsche Klinik 11, Berlin u. Wien 1903, S. 147.

⁵⁾ Immerhin kann Chloroform wegen der Schädigung, welche die autolytischen Fermente durch dieses (im Gegensatz zu 1%iger Borsäure, 0,5%iger Salizylsäure und gesättigtem Senfölgewasser) erleiden [Yoshimoto, Zeitschr. f. physiol. Chem. 58 (1909) 341], nicht immer in Anwendung kommen.

⁶⁾ Hergestellt durch Schütteln von 5 ccm Chloroform mit 1 Liter Wasser und Filtration.

Stickstoff nach Kjeldahl zu bestimmen. In derselben Weise werden nach längeren Zeitintervallen (2—8 Tagen) analoge Bestimmungen an der autolysierenden Masse ausgeführt.

Handelt es sich um differenzierte Stickstoffbestimmungen, so ist die Autolyse an der doppelten mit 1 Liter Chloroformwasser angesetzten Menge Leberbrei während längerer Zeit, z. B. 3 Tagen, bei 38° durchzuführen und das Eiweiß durch Aufkochen in einer Porzellanschale mit 10 g Monokaliumphosphat aus dem Autolysat zu entfernen. Nach dem Erkalten wird der ganze Inhalt der Porzellanschale in einen 1 Liter-Meßkolben übergespült, bis zur Marke aufgefüllt und durch ein trockenes Filter filtriert. Hierauf engt man 800 ccm des Filtrates auf mehr als das Doppelte ein, füllt auf 400 ccm auf und filtriert wieder. 20 ccm des Filtrates werden dann zur Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet. Ein weiterer Anteil der Flüssigkeit dient zur Bestimmung des Stickstoffs der Monoaminosäuren. Zu dem Zweck werden 50 ccm der Lösung in einem 100-ccm-Meßkölbchen mit 5 ccm Salzsäure vom spez. Gew. 1,124 versetzt und danach bis zum Ausbleiben weiterer Niederschlagsbildung Phosphorwolframsäure hinzugefügt. Danach wird bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt, durch ein trockenes Filter filtriert und wiederum in 20 ccm des Filtrates der Stickstoff nach Kjeldahl ermittelt.

Zur Bestimmung des Albumosestickstoffs werden 50 ccm des Filtrates mit 1 ccm verdünnter Schwefelsäure und mit pulverisiertem Zinksulfat bis zur Sättigung versetzt. Nach 24stündigem Stehen wird der Albumoseniederschlag abfiltriert, mit angesäuerter Zinksulfatlösung nachgewaschen und lufttrocken mit dem Filter nach Kjeldahl verbrannt. Der Purinbasenstickstoff wird an 100 ccm des Filtrates ermittelt. Zunächst werden in dieser Flüssigkeitsportion die Phosphate durch Alkalisieren mit wenig Tropfen Ammoniak ausgefällt, dieselben abfiltriert und nachgewaschen. Das Filtrat wird dann mit mehr Ammoniak und 3 %iger ammoniakalischer Silbernitratlösung bis zum Aufhören einer weiteren Fällung versetzt, nach dem Stehenlassen im Dunkeln während 10—12 Stunden der Niederschlag abfiltriert, mit ammoniakhaltigem Wasser bis zum Ausbleiben der Chlorsilberreaktion nachgewaschen und der lufttrockene Rückstand gleichfalls mit dem Filter nach Kjeldahl verbrannt. Bei allen vier Bestimmungen werden die erhaltenen Stickstoffwerte auf 1 kg Leber umgerechnet.

Auch das histologische Bild vermag Aufschluß darüber zu geben, ob in vivo eine gesteigerte Autolyse aus irgend einem der im folgenden

angeführten Gründe stattgefunden hat. Launoy¹⁾, Waldvogel²⁾, L. Heß und Saxl³⁾ sowie Cruickshank⁴⁾ haben auf die große Analogie der Bilder hingewiesen, welche einerseits autolytische Zellen, anderseits Zellen im Zustand fettiger Degeneration aufweisen. Die fettige Degeneration ist aber gerade Krankheiten eigentümlich, die mit gesteigerter Autolyse einhergehen, so der akuten gelben Leberatrophie, der Phosphorvergiftung. Dasselbe Bild (Kerndegeneration, Myelinkugeln, Oedeme des Plasmas) zeigen dann ferner auch hungernde Zellen, in welchen ja ebenfalls der autolytische Eiweißzerfall vermehrt ist⁵⁾.

Die Ermittlung der Heterolyse tierischer Organe: Den Uebergang zwischen den früher genannten Proteasebestimmungsmethoden mit einem vollständig fremden Substrat und den autolytischen Methoden, bei denen die Protease eines Organs das organeigene Eiweiß abbaut, bildet das heterolytische Verfahren, welches Jacoby⁶⁾ ausgearbeitet hat. Bei der Heterolyse⁷⁾ bauen die Proteasen eines Organs die Eiweißkörper eines anderen Organs ab. So hat Jacoby unter dem Einfluß von Leberferment Lungenalbumosen abgebaut, wobei er sich folgender Versuchsmethode bediente. Leber sowohl als Lunge desselben durch Verbluten getöteten Hundes wurden unmittelbar nach dessen Tode fein zerhackt. Dann wurden 100 g des Leberbreis mit derselben Menge 9%iger Kochsalzlösung unter Toluolzusatz gut vermischt und bald darauf filtriert. Von dem erhaltenen proteaseführenden Lebersaft wurden nun abgemessene Mengen (10—25 ccm) zu Gemischen von Lungenbrei (10—100 g), physiologischer Kochsalzlösung und Toluol gefügt und gleichzeitig Proben mit Kochsalzlösung,

¹⁾ Launoy, Ann. Inst. Pasteur 23 (1909) 1, 979.

²⁾ Waldvogel, Archiv f. klin. Medizin 82 (1905) 437.

³⁾ L. Heß u. Saxl, Virchows Archiv 202 (1910) 148.

⁴⁾ Cruickshank, Journ. Pathol. Bacteriol. 16 (1911) 167; Biochem. Zentralbl. 12, 3425.

⁵⁾ Adrienne Köhler, loc. cit., S. 240, Fußnote 7.

⁶⁾ Jacoby, Hofmeisters Beitr. 3 (1903) 446.

⁷⁾ Ueber Heterolyse bei Tumoren, die dort wegen der Pathogenität eine besonders große Rolle spielt, da sich die Tumorermente gegen das Eiweiß usw. der befallenen Gewebe richten, siehe Neuberg, Berliner klin. Wochenschr. (1905) 115; Arbeit. a. d. pathol. Inst. Berlin, Festschrift, Berlin 1906, S. 593; Biochem. Zeitschr. 26 (1910) 344; Blumenthal, Jacoby u. Neuberg, Med. Klinik (1909) 1595; Blumenthal u. Neuberg, Zeitschr. f. Krebsforschung 10 (1911) 246; Blumenthal u. Wolff, Med. Klinik (1905) 166; Heß u. Saxl, Berliner klin. Wochenschr. (1908) 1183; Beitr. z. Karzinomforschung 1 (1909) Heft 1; Biochem. Zentralbl. 9, 1473; Kepinow, Zeitschr. f. Krebsforschung 7 (1909) 1.

Lungenbrei und Toluol allein angesetzt. Bei den letzteren wurde ebenso viel physiologische Kochsalzlösung zugefügt, als die Anzahl Gramm Lungenbrei bei dem betreffenden Versuch betrug. Bei den Versuchen mit Lebersaft ersetzte die verwendete Menge desselben eine entsprechende Anzahl Kubikzentimeter physiologischer Kochsalzlösung. Alle diese Proben, sowie auch Proben mit Lebersaft und Toluol allein wurden dann 1—2mal 24 Stunden im Brutschrank von 37° belassen und hierauf die lebersaftfreien mit einer Anzahl nur Lebersaft enthaltenden Proben versetzt, während andere Proben des Lebersaftes allein zur weiteren Untersuchung verwendet wurden. Nach dem Ausfällen eines Teils der Proben durch Sättigung mit stickstofffreiem Zinksulfat und stickstofffreier Schwefelsäure bis zum Gehalt von 0,4% wird der abgesetzte Niederschlag filtriert, mit dem Fällungsmittel nachgewaschen und in abgemessenen Portionen der Filtrate der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Es zeigte sich, daß der nicht aussalzbare Stickstoff des Lungengewebes eine Zunahme erfahren hatte, im Gegensatz zum nichtkoagulablen (Mononatriumphosphatkoagulation), welcher unverändert war. Daraus ergibt sich, daß der Zusatz von Lebersaft zu autolysierendem Lungengewebe die peptische Wirkung der Lungenprotease vermehrt, die proteolytische Phase gegenüber dem genuinen Eiweiß dagegen unbeeinflusst läßt. Die Versuchsanordnung von Jacoby gibt jedoch in der Hauptsache ein Bild über den Kombinationseffekt von Autolyse und Heterolyse am Lungengewebe, wobei die gegenseitige Beeinflussung der beiden Organproteasen eine nicht zu unterschätzende Fehlerquelle darstellen dürfte. Die Heterolyse allein müßte dagegen durch Einwirkung des proteasehaltigen Saftes eines Organs auf das sterile Gewebe eines anderen Organs studiert werden, in welchem die organeigenen Proteasen und damit die Ursache der Autolyse zuvor durch sofortiges Kochen des Organbreies frisch getöteter Tiere ausgeschaltet worden sind.

Das Kochen muß hinreichen, um die ganze Masse zu sterilisieren. Auch muß die Verteilung des Organs mittels der Fleischhackmaschine fein genug sein, damit nicht Fermente in den innersten Teilen der Organbröckchen unzerstört zurückbleiben, was gerade die Voraussetzung ist für die aseptische Autolyse nach Conradi¹⁾. Bei dieser wird das unter allen Kautelen der Asepsis sofort nach dem raschen Tod des Tieres herausgenommene Organ als ganzes während 1 bis 2 Minuten in siedendes Wasser getaucht und nach dem Abschrecken durch Einbringen in ca. 10 Liter steriles kaltes Wasser die Autolyse in steriler feuchter Kammer bei 37° durchgeführt.

¹⁾ Conradi, Hofmeisters Beitr. 1 (1902) 186; siehe ferner Magnus-Levy, Ebenda 2 (1902) 261.

Begünstigende und hemmende Faktoren bei der Autolyse. Da die Resultate gegenüber irgendwelchen Substraten in weitgehendstem Maße von der Reaktion des Mediums beeinflußt werden, so ist die Methode, nach welcher der Organsaft gewonnen wird, von größter Bedeutung. Nach dem Verfahren von Hata¹⁾ z. B. (nach welchem 100 g gut zerhackter und in der Reibschale fein zerriebener Pferdeleber mit derselben Menge [0,85% Kochsalz enthaltender] $\frac{1}{20}$ normaler Salzsäure und 10 ccm Chloroform kräftig durchgeschüttelt und 7 Tage unter öfterem Umschütteln bei Zimmertemperatur stehen gelassen werden) ist die durch Gase kolierte, mit Normalsodalösung neutralisierte Lösung²⁾ nur zur Verflüssigung der leicht angreifbaren Chloroformgelatine befähigt. Dagegen besitzt der nach Hedin und Rowland³⁾ gewonnene Organpreßsaft⁴⁾ nach dem Ansäuern mit $\frac{1}{4}$ %iger Essigsäure starke Wirkungen gegenüber verschiedenen Substraten, z. B. Fibrin, im Gegensatz zu neutralen oder gar alkalischen Organpreßsäften. Die günstigste Azidität wurde von Arinkin⁵⁾ bei der Leberautolyse im Intervall von $\frac{1}{32}$ — $\frac{1}{130}$ normal aufgefunden. Auch zeigte Milchsäure einen spezifisch begünstigenden Einfluß. Die Säurewirkung kann auch eine indirekte sein wie bei der Kohlensäure, indem sie, wie Belazzi⁶⁾ zeigte, die schädigend wirkende alkalische Reaktion⁷⁾ auf-

¹⁾ Hata, Biochem. Zeitschr. 16 (1909) 383.

²⁾ Ohne die fermentative Wirkung wesentlich zu steigern, kann man die fermentführende Flüssigkeit weiteren Reinigungsoperationen unterwerfen, indem man sie mit einem Tropfen Ammoniak und danach mit Ammoniumsulfat bis zu $\frac{1}{3}$ Sättigung versetzt, den Niederschlag abfiltriert, zum Filtrat weiter Ammoniumsulfat bis zu 70 % Sättigung zugibt, den Niederschlag wiederum filtriert und nach dem Lösen in destilliertem Wasser zum Versuch verwendet. Man kann auch die Fällung an dem durch Zerreiben des feinen Leberbreis mit der vierfachen Wassermenge und Quarzsand und 2stündigem Schütteln auf der Schüttelmaschine gewonnenen Extrakt mit Uranylacetat nach der Methode von Rosell, Ueber Nachweis und Verbreitung intrazellulärer Fermente, Straßburg 1901, ausführen. Siehe nähere Angaben über die weitere Reinigung des Fermentes in der Originalarbeit von Rosell.

³⁾ Hedin u. Rowland, Zeitschr. f. physiol. Chem. 32 (1901) 341, 531.

⁴⁾ Der die Fleischhackmaschine verlassende Leber-, Milz-, Nieren- oder Drüsenbrei wird in der gewohnten Weise mit Kieselgur oder Quarzsand zerrieben und mittels der hydraulischen Presse ausgepreßt.

⁵⁾ Arinkin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53 (1907) 192.

⁶⁾ Belazzi, Zeitschr. f. physiol. Chem. 57 (1908) 389; siehe ferner Hedin, An explan. of the infl. of acid. and alkali on the aut. of organs, Festschrift für Olof Hammarsten, Upsala Läkarefören Förh. [N. F.] 11 (1906) Suppl.; Biochem. Zentralbl. 5 (1893).

⁷⁾ Vgl. Schwiening, Virchows Archiv 136 (1896) 444; Preti, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52 (1907) 485.

hebt. Zugleich wirkt aber die Kohlensäure noch in anderer Hinsicht, wie Laqueur¹⁾ zeigte, spezifisch begünstigend auf die Autolyse ein. Da sie in gerade entgegengesetzter Richtung wirkt wie der die Autolyse stark hemmende Sauerstoff, so legt dies den Gedanken nahe, daß diese beiden Gase ihre Wirkung in einer Beeinflussung der Resistenz des autolysierenden Gewebes besitzen, die engste mit den Vorgängen der inneren Atmung und der Art der Bindung des Sauerstoffs im lebenden Eiweiß zusammenhängen dürfte. Man könnte sich vorstellen, daß es die Peroxydbindung des Sauerstoffs wäre, welche die Vermittlerin wichtigster vitaler Funktionen ist und in welcher zugleich die Resistenz des lebendigen Eiweißes hydrolysierenden Prinzipien gegenüber begründet liegt. Mit der Verdrängung des Sauerstoffs durch die Kohlensäure geht die spezifische Schutzwirkung und zugleich mit dieser das Charakteristische des lebendigen Eiweißes verloren. Bei dem engen Zusammenhang zwischen den Zuständen des Sauerstoffmangels und der Narkotikawirkung auf die Zelle²⁾ erklärt es sich ferner, daß die Autolyse auch durch die besondere Art der Asphyxie, wie sie die Narkose darstellt, nach den Untersuchungen von Chiari³⁾ eine sehr erhebliche Begünstigung erfährt. Die Begünstigung von Oxydationsvorgängen durch ein leicht alkalisches Medium stellt auch die Beziehung her zu der Vorstellung, daß die Resistenz des lebenden Gewebes einen der wichtigsten die Autolyse beeinflussenden Faktoren darstellt und der früheren, von Preti (l.c.) und von Drjewezki⁴⁾ bekämpften Auffassung von Wiener⁵⁾, daß die Blutalkaleszenz die Autolyse durch die organeigenen Proteasen in vivo verhindere. Daneben könnten auch kolloidchemische Beeinflussungen von seiten der Wasserstoffionen und Hydroxylionen wie auch der Ionen von Neutral- und Schwermetallsalzen gegenüber den Organeiweißkörpern wie gegenüber den Organproteasen und den übrigen

¹⁾ Laqueur, Zeitschr. f. physiol. Chem. 79 (1912) 82.

²⁾ Siehe hierüber die Arbeiten von Verworn, z. B. in Verworn, Allg. Physiol. 3. Aufl. 396, Biogenhypothese, Jena 1903, S. 76; Narkose, Vortrag vor der Harvey Soc. New York, Oktober 1911, Jena 1912, und seiner Schüler, insbesondere Winterstein, Zeitschrift f. allg. Physiol. 1 (1901) 19, 5 (1905) 323 u. Fröhlich, Ebenda 3 (1903) 75, sowie die Untersuchungen von Mansfeld, Pflügers Archiv 129 (1909) 69; siehe ferner Breslauer u. Woker, Zeitschr. f. allg. Physiol. 13 (1911) 232; Helene Weyland, Inaug.-Dissert., Bern 1914; Zeitschr. f. allg. Physiol. 16 (1914) 123; Woker u. Weyland, Ebenda 16 (1914) 265; Woker, Ebenda 15 (1913) 49.

³⁾ Chiari, Archiv f. experim. Pathol. 60 (1909) 256.

⁴⁾ Drjewezki, Biochem. Zeitschr. 1 (1906) 229.

⁵⁾ Wiener, Zentralbl. f. Physiol. 19 (1905) 349.

autolytischen Fermenten¹⁾ in Frage kommen. In dieser Hinsicht ist die ziemlich allgemein beobachtete Hemmung der Citrate mit ihrem dreiwertigen Anion und dessen Gegenwirkung gegenüber den bekanntlich positivierend wirkenden Erdalkalisalzen insbesondere denjenigen des Kalziums und Bariums²⁾ sehr bemerkenswert. Für Lithiumsalze hat Colwell³⁾ einen spezifisch hemmenden Einfluß der Autolyse angegeben. Kaliumionen wirken dagegen nur bei einzelnen Organen (Milz und Niere) hemmend auf die autolytischen Prozesse.

Mit Rücksicht auf die therapeutische Anwendung kolloider Metalllösungen ist bemerkenswert, daß Silbersol sowie kolloide Palladiumlösungen die Leberautolyse begünstigen⁴⁾ und daß auch bei den kolloiden Metallhydroxyden wie dem Aluminiumhydroxyd, dem Ferrihydroxyd, ferner dem Mangandioxyd, sowie dem Arsentrisulfid schon in Spuren eine Vermehrung der Autolyse beobachtet werden kann, die aber bei Ueberschreitung einer von Substanz zu Substanz wechselnden Konzentrationsgrenze in eine Hemmung umschlägt. Dieselben Beobachtungen stellten Truffi⁵⁾ bei Quecksilbersalzen, Izar⁶⁾ bei Silbersalzen, Preti⁷⁾ bei Bleisalzen und bei einer Reihe von anderen Salzen des Eisens, Mangans, Aluminiums und Kobalts⁸⁾ fest. Auch hier macht sich die hemmende Wirkung des Zitratanions in der Beobachtung von Pollini⁹⁾ geltend, daß Eisenzitat eine schwächer fördernde Wirkung auf die Autolyse besitzt als anorganische Eisensalze. Wie bei den Schwermetallen und Schwermetallsalzen, so hat sich auch bei den verschiedensten anderen anorganischen und organischen Giften, wie Jodkalium¹⁰⁾, Jod, Phosphor¹¹⁾ und in besonders ausgeprägtem Maße den Arsenverbindungen¹²⁾, welch letztere nur bis

¹⁾ Lipasen, Diastasen, Nukleasen, Purinamidasen.

²⁾ Launoy, *Compt. rend. Soc. Biol.* **62** (1907) 487, 1175; Brüll, *Biochem. Zeitschr.* **29** (1910) 408.

³⁾ Colwell, *Arch. Middlesex Hosp.* **19** (1910) 59.

⁴⁾ Ascoli u. Izar, *Biochem. Zentralbl.* **6** (1907) 192, **7** (1907) 142, **10** (1907|08) 356, **14** (1908) 491, **17** (1909) 361.

⁵⁾ Truffi, *Biochem. Zeitschr.* **23** (1909) 270.

⁶⁾ Izar, *Biochem. Zeitschr.* **20** (1909) 249.

⁷⁾ Preti, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **58** (1909) 539.

⁸⁾ Preti, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **60** (1909) 317.

⁹⁾ Pollini, *Biochem. Zeitschr.* **47** (1912) 396.

¹⁰⁾ Stookey, *Proc. Soc. Experim. Biol. New York* **5** (1908) 119; Kepinow, *Biochem. Zeitschr.* **37** (1911) 238; Kaschiwabara, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **82** (1912) 425.

¹¹⁾ Saxl, *Hofmeisters Beitr.* **10** (1907) 447.

¹²⁾ Heß u. Saxl, *Zeitschr. f. experim. Pathol.* **5** (1908) 89; Izar, *Biochem. Zeitschr.* **21** (1909) 46; *Arch. di Farmac.* **9**, 254.

0,7 mg Arsen pro 100 g Substanz eine fördernde, in höheren Konzentrationen¹⁾ dagegen eine hemmende Wirkung ausüben, ein Konzentrationsoptimum für den aktivierenden Einfluß herausgestellt. Umgekehrt fanden Heß und Saxl²⁾, daß Diphtherie-, Tetanus- und Staphylotoxin sowie Tuberkulin in geringen Dosen hemmend, in stärkeren aktivierend auf die Autolyse und zwar insbesondere auf diejenige der Nebenniere³⁾ zu wirken vermögen. Bei Tumoren hat sich ebenfalls eine sehr starke Steigerung der Autolyse durch Injektion metallorganischer Verbindungen⁴⁾ und insbesondere von Selenverbindungen⁵⁾ bewerkstelligen lassen, die bis zur völligen Auflösung des Tumors gehen kann⁶⁾.

Außer der Reaktion des Mediums und der Gegenwart kolloid-chemisch aktiver Ionen und anderer Produkte, welche auf Proteasen und Substrat einzuwirken vermögen, ist natürlich auch die Herkunft der Proteasen bestimmend für ihren verdauenden Effekt.

Eine wenigstens bei schwach alkalischer Reaktion⁷⁾ besonders starke Wirkung⁸⁾ gegenüber den verschiedensten Substraten⁹⁾ zeigen

¹⁾ Immerhin wirken äußerst geringe Mengen (0,02 mg Arsen) nach Laqueur u. Ettinger, Zeitschr. f. physiol. Chem. **79** (1912) 1. sowie Izar, loc. cit. vorige Fußnote, wieder hemmend.

²⁾ Heß u. Saxl, Wiener klin. Wochenschr. (1908) 248.

³⁾ Barlocco, Biochem. Zentralbl. **11** (1910) 1279; Bakteriolog. Zentralbl. **58** (1911) 48; Cruickshank, Journ. Pathol. Bact. **16** (1911) 167; Pesci, Bakteriolog. Zentralbl. **59** (1911) 71, 186.

⁴⁾ Neuberg, Caspari u. Löhe, Berliner klin. Wochenschr. (1912) 1405.

⁵⁾ Wassermann, Berliner klin. Wochenschr. **1** (1912) 206.

⁶⁾ Siehe ferner über Autolyse von Tumoren unter verschiedenen Einflüssen Emerson, Archiv f. klin. Medizin **72** (1902) 415; Petry, Hofmeisters Beitr. **2** (1902) 94; Heß u. Saxl, Wiener klin. Wochenschr. (1908) 1183; Yoshimoto, Biochem. Zeitschr. **22** (1909) 299; Neuberg, Zeitschr. f. Krebsforschung **2** (1904) 171; Wohlgemuth, Berliner klin. Wochenschr. (1904) 704; Heile, Zeitschr. f. klin. Medizin **55** (1904) 508; Loewenthal u. Edelstein, Biochem. Zeitschr. **14** (1908) 484; Colwell, Arch. Middlesex Hosp. **19** (1910) 55.

⁷⁾ Bradley, Il. of Hygiene **10** (1910) 209; Opie, Il. of experim. Med. **7** (1905) 759, **8** (1906) 410, 536, **9** (1907) 391; Opie and Barker, Ebenda **10** (1908) 645, **11** (1909) 686.

⁸⁾ Immerhin wurde von Opie und seinen Mitarbeitern (loc. cit. vorige Fußnote) in Lymphozyten, von Jobling, Journ. of experim. Med. **16** (1912) 270; Biochem. Zentralbl. **14**, 802, auch in Leukozyten ein in saurer Lösung wirksames proteolytisches Ferment aufgefunden.

⁹⁾ Gelatine, Kasein, koaguliertes Hühnereiweiß, Fibrin, Peptone, Blutserum, sowie das Eiweiß von Exsudaten [siehe über die Autolyse von Exsudaten Ueber, Münchener med. Wochenschr. (1902) 1169; Derselbe, Zeitschr. f. klin. Medizin **48** (1908) 364; Guidi, Pathologica **2**, 418; Biochem. Zentralbl. **11**, 3148; Zak,

Leukozytenfermente¹⁾, welche Jochmann und Lockemann²⁾ lativ ziemlich weitgehend reinigten, durch 1—2tägige Autolyse bei 5°, Alkohol-Aetherfällung, Extraktion des Niederschlags mit Glycerin, wiederum 1—2tägiges Stehen, Eingießen in die 5—6fache Menge des Gemisches von 2 Teilen Alkohol und 1 Teil Aether, Filtration und Trocknen des fermentführenden Niederschlags im Vakuum-sikkator.

Siehe weitere Literatur über Autolyse; Cloetta, Ann. Chim. Phys. [3] (1856) 369; Biondi, Virchows Archiv **144** (1896) 373; Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chem. **30** (1900) 149; Hofmeisters Beitr. **3** (1903) 446; Stoffwechsel der Leber in Oppenheimers Handb. d. Biochem. **2** (1908) 1; Oker-Blom, Skand. Arch. Physiol. **14** (1903) 48; Matthes, Archiv f. experim. Pathol. **51** (1904) 442; Ekson, Journ. med. Research. **21** (1909) 281; Wolbach u. Saiki, Ebenda (1909) 267; Richet, Compt. rend. Soc. Biol. **55** (1903) 656; Arnheim, Zeitschr. physiol. Chem. **40** (1903) 234; Levene, Ebenda **41** (1904) 393; Kutscher u. Mori, Zentralbl. f. Physiol. (1904) 248; Abderhalden u. Prym, Zeitschr. physiol. Chem. **53** (1907) 320; Longcope, Journ. med. Research **18** (1908) 45; Mond, Journ. Physiol. et Pathol. gén. (1908) 1050; Satta u. Fassani, Arch. Fisiol. **8**, 497; Berliner klin. Wochenschr. **47** (1910) 1500; Simon, Zeitschr. physiol. Chem. **70** (1910) 64; Billard, Compt. rend. Soc. Biol. **69** (1910) 487, 488, 520; Pickel u. Minami, Berliner klin. Wochenschr. (1911) 3; H. Meyer u. Fr. Bering, Fortschritte f. Röntgenstr. **17** (1911) 33; vgl. Berliner klin. Wochenschr. (1905) 376; Galdi, La Clinica Med. Ital. (1905) 2; Chem. Zentralbl. **3**, 2088.

¹⁾ Leber, Die Entstehung d. Entzünd., Leipzig 1891; Knapp, Zeitschr. Mikrokunde **23**, Heft 9; Erben, Ebenda **24** (1903) 70; Münchener med. Wochenschr. (1906) 2567; Zentralbl. f. inn. Medizin (1907) 81; Schumm, Hofmeisters Beitr. **4** (1904) 442; Jochmann, siehe folgende Fußnote; Pfeiffer, Wiener med. Wochenschr. **42** (1906) 1249; Hertz, Münchener med. Wochenschr. (1908) 1; Müller u. Jochmann, Ebenda (1903) 1507; Müller, Archiv f. klin. Medizin **91** (1907) 291, **92** (1908) 199; Zentralbl. f. inn. Medizin **28** (1907) 297; Arnheim u. Eppenstein, Schles. Ges. f. vaterländ. Kultur, 1906; Biochem. Zentralbl. **5** 1359; Opie, loc. cit.; Barker, Journ. of experim. Med. **10** (1908) 666; Fiessinger u. Marie, Compt. rend. Soc. Biol. **66** (1909) 915; Journ. Biol. **11** (1909) 611, 887; Dochez, Journ. f. experim. Medizin **11** (1909) 718; Berger, Archiv f. Dermatol. **101** (1910) 247; Eiselt, Zeitschr. f. klin. Medizin **75** (1912) 91; über die wahrscheinlich den Leukozyten entstammenden Proteasen siehe Babcock u. Russell, Zentralbl. f. Bakteriologie. [2] **6** (1900) 45, 79; Freudenreich, Milch-Ztg. **29** (1900) 245; Wender, Oesterr. Milch-Ztg. (1903) 1; Moro, Jahrb. d. Kinderheilkunde [N. F.] **16** (1902) 391; Müller, Biochem. Zentralbl. **3** (1905) 411.

²⁾ Jochmann u. Lockemann, Hofmeisters Beitr. **11** (1903) 449; siehe ferner Jochmann u. Müller, Münchener med. Wochenschr. (1906) 2002; Jochmann u. Ziegler, Ebenda (1906) 2093; Ziegler u. Jochmann, Deutsche med. Wochenschr. (1907) 749; Jochmann, Virchows Archiv **194** (1903) 352; Zeitschr. f. Hygiene **61** (1903) 71; Derselbe, Archiv f. Gynäkol. **89** (1909) 503.

ferner die zusammenfassenden Darstellungen von Launoy, Bull. Inst. Pasteur **6**, 289, 337; A. Oswald, Biochem. Zentralbl. **3** (1905) 365; Vernon, Intrazellulär Enzyms, London 1908; Ergebnisse d. Physiol. **9**, 138.

Ueber Autolyse einzelner Organe mit Ausnahme der Leber, auf welche sich die meisten der bisher angeführten Arbeiten beziehen, siehe Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chem. **33** (1901) 126, und die bei der Fibrinolyse genannten Arbeiten anderer Forscher (Lunge).

Vogel, Archiv f. klin. Medizin **72** (1902) 291; Schmidt-Nielsen, Hofmeisters Beitr. **3** (1903) 266, **4** (1903) 182; v. Fürth, Ebenda **3** (1903) 543 (Muskel).

Hedin u. Rowland, Zeitschr. f. physiol. Chem. **32** (1901) 341, 531; Hedin, Journ. Physiol. **30** (1904) 155; Biochem. Journ. **2** (1907) 112; Leathes, Journ. Physiol. **28** (1902) 360; Schumm, Hofmeisters Beitr. **3** (1903) 576, **7** (1905) 175; Levene, Amer. Journ. Physiol. **11**, 437, **12** (1905) 276; Cathcart, Journ. Physiol. **32** (1905) 299; Trampedach, Archiv f. d. ges. Physiol. **141** (1911) 591; Lieblein, Zeitschr. f. Krebsforschung **9** (1910) 609 (Milz).

Matthes, Zentralbl. f. Gynäkol. (1901) 1385; Ascoli, Zentralbl. f. Physiol. (1902) 124; Merletti, Rass. ostetr. e gin. (1903); Biochem. Zentralbl. **1**, 1330; Raineri, Atti della Soc. ital. di ostetr. e gin. **10** (1905); Biochem. Zentralbl. **4**, 1204; Basso, Archiv f. Gynäkol. **76** (1905) 162; Graefenberg, Zeitschr. f. Geburtshilfe **65** (1909) 1 (Plazenta).

Levene u. Stookey, Journ. med. Research **10**, 212; Biochem. Zentralbl. **2**, 294; Simon, Zeitschr. f. physiol. Chem. **72** (1911) 463 (Gehirn).

Murachi, Arbeit. a. d. neurolog. Inst. Wien **19** (1912) 390; Biochem. Zentralbl. **14**, 2353 (Rückenmark).

Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chem. **34** (1902) 114; Rhodin, Ebenda **75** (1911) 197 (Thymus).

Hildebrandt, Hofmeisters Beitr. **5** (1904) 463 (Milchdrüse).

Levene, Zeitschr. f. physiol. Chem. **41** (1904) 393; Mochizuki u. Kotate, Ebenda **43** (1904) 165 (Hoden).

Langstein u. Neubauer, Münchener med. Wochenschr. (1902) 1249; Ferroni, Ann. di ostetr. e gin. (1906); Biochem. Zentralbl. **5**, 2198 (Uterus).

Dakin, Journ. Physiol. **30** (1904) 84; Minerbi, Rif. med. (1903) 6; Biochem. Zentralbl. **1**, 1422; Kutscher u. Seemann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **34** (1901/02) 528, **35** (1902) 432 (Darm).

Morpurgo u. Satta, Archiv. ital. Biol. **49** (1908) 330, 383; Giorn. real. Akad. Med. Torino (1907) 7, 8, (1908) 1, 2 (Knochen).

Schlesinger, Hofmeisters Beitr. **4** (1903) 87; Mendel u. Leavenworth, Amer. Journ. Physiol. **21** (1903) 69 (Embryonen).

Clapp, Journ. Amer. Med. Ass. **56** (1911) 807 (Kristalllinse).

Anwendung von Proteasen zur Substratbestimmung.

Wie die Wirkungen der Proteasen zu ihrer Ermittlung dienen, so können dieselben andererseits auch für die Analyse ihrer Substrate herangezogen werden, ist doch das ungleiche Verhalten von Polypeptiden gegenüber peptolytischen Enzymen verschiedenen Ursprungs,

sowie insbesondere die Identifizierung der unter dem Einfluß dieser Enzyme entstandenen Spaltprodukte geeignet, Licht in die verwickeltesten Fragen konstitutiver Natur in diesem Gebiete zu tragen ¹⁾).

Doch auch der praktische Chemiker bedient sich der Proteasen, um Aufschluß über die Beschaffenheit eines Substrats zu erlangen und zwar vor allem dort, wo es sich darum handelt, die Verdaulichkeit eines Nahrungs- bzw. Futtermittels festzustellen. Gewöhnlich wird die Prüfung der Zugänglichkeit eines Materials für die Wirksamkeit der Proteasen mit einer Methode kombiniert, welche Aufschluß über das Verhalten gegenüber diastatischen Agenzien zu geben vermag.

Große Verbreitung hat ein von Stutzer und Isbert ²⁾ zu diesem Zweck ausgearbeitetes Verfahren gefunden, welches durch sukzessive Einwirkung von Ptyalin oder Malzdiastase, Pepsin und Trypsin auf das zu prüfende Nahrungs- oder Futtermittel die darin enthaltenen organischen Stoffe quantitativ in verdauliche und unverdauliche Bestandteile trennt.

Die genannten Forscher verfahren dabei im einzelnen in der Weise, daß sie 2 g Untersuchungsmaterial, nach dem Entfetten ³⁾ und Aufkochen mit 100 ccm Wasser, mit 25 ccm einer Lösung von Malzdiastase ⁴⁾ 2 Stunden auf einer Temperatur von 60—65° belassen, danach 400 ccm Pepsinlösung hinzufügen und endlich nach dem Filtrieren durch Asbest mit 100 ccm Pankreasflüssigkeit während 3 Stunden auf 37—40° erwärmen. Der ungelöste Rückstand wird nun auf einem Asbestfilter gesammelt, ausgewaschen, in einer Platinschale bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, gewogen und verascht. Die Asche wird danach mit Salpetersäure zur Austreibung der Kohlensäure behandelt, nochmals bis zur Gewichtskonstanz geglüht und gewogen. Es ergibt dann die Differenz der beiden Wägungen das Gewicht der unverdauten, fettfreien, organischen Stoffe, welche ihrerseits in einen stickstoffhaltigen (Proteine) und einen stickstofffreien Anteil (Kohlenhydrate, vor allem Zellulose) zerfallen. Der erstere wird durch Bestimmung des Stickstoffs an dem bei einem Parallel-

¹⁾ Siehe darüber die große Zahl der Arbeiten über Polypeptide von Emil Fischer, Abderhalden und deren Schülern, loc. cit. und im *Allg. Teil*.

²⁾ Stutzer u. Isbert, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 12 (1888) 72.

³⁾ Nach Köhler, Bornstein u. Zielstorff, *Landwirtsch. Versuchsstat.* 45 (1894) 193, ist eine Entfettung der Futtermittel nicht unbedingt erforderlich.

⁴⁾ Dasselbe erreicht man während derselben Zeit mit 200 ccm einer Ptyalinlösung bei 37—40°. Doch muß in diesem Fall vor dem Pepsinzusatz durch ausgeglühten Asbest filtriert und der Rückstand gewaschen werden, da sich sonst mit der Pepsinsalzsäure eine flockige Ausscheidung bildet.

versuch erhaltenen unverdauten, aber natürlich unveraschten Rest ermittelt und durch Multiplikation mit 6,25 auf die entsprechende Proteinquantität umgerechnet. Die Menge der unverdaulichen Kohlenhydrate ergibt sich dann durch Abzug des für die Proteine erhaltenen Wertes von der Gesamtmenge.

Nach Pfeiffer¹⁾ soll jedoch diese Methode namentlich bei rohfaserreichen Futtermitteln zu irrigen Resultaten führen, und es sind denn auch von Stutzer²⁾ selbst wie von anderen³⁾ Abänderungsvorschläge gemacht worden, welche im wesentlichen⁴⁾ auf eine Vermehrung der Pepsinmenge (auf 500 cm) und eine Verlängerung der bei 37—40° vorzunehmenden Pepsinverdauung auf 48 — ja bei schwer angreifbaren harzhaltigen Futtermitteln sogar auf 72 bis 84 Stunden hinauslaufen⁵⁾. Erwähnt seien hier auch die Eiweißbestimmungen durch Fällung mittels Kupfersulfat und Natronlauge nach Stutzer-Barnstein und durch Fällung des wäßrigen Auszugs mittels Tanninlösung. Der Abzug des Amidstickstoffs vom Gesamtstickstoff würde den Eiweißstickstoff ergeben. Doch hat Westhauser⁶⁾ auf die großen Differenzen der nach diesen beiden Verfahren erhaltenen Resultate hingewiesen, wenn die durch Pepsin gebildeten Spaltprodukte in Frage kommen, namentlich wenn die Pepsinspaltung im schwach salzsauren Medium (0,062 % HCl) vollzogen wird. Während bei dem ursprünglichen Verfahren von Stutzer und Isbert, wie bei seinen verschiedenartigen Modifikationen nur Proteine und Kohlenhydrate Berücksichtigung finden, bedienen sich Pfeiffer und Riecke⁷⁾ in Anlehnung und Verbesserung der Dormeyerschen Methode⁸⁾ unter Zuhilfenahme eines eigens von ihnen zu diesem Zweck konstruierten Apparates gerade für die Fettbestimmung in Futtermitteln, tierischen Geweben usw. der verdauenden Wirkung des Pepsins.

Es würde überflüssig sein, diesen Abschnitt mit der nochmaligen

¹⁾ Pfeiffer, Zentralbl. f. Agrikulturchemie (1888) 115.

²⁾ Stutzer, Landwirtsch. Versuchsstat. 36 (1889) 321; 38 (1890) 277; 40 (1891/92) 163.

³⁾ Kühn, Thomas u. Böttcher, Landwirtsch. Versuchsstat. 44 (1894) 188; Köhler, Zielstorff u. Bornstein, loc. cit. Fußnote 3, vorige Seite.

⁴⁾ Darüber, ob es empfehlenswert ist, die Salzsäure portionenweise in 1—2stündigen Pausen zuzusetzen, gehen die Meinungen auseinander.

⁵⁾ Dafür kann die Nachbehandlung mit Trypsin weggelassen werden.

⁶⁾ Westhauser, Zeitschr. f. physiol. Chem. 72 (1911) 363.

⁷⁾ Pfeiffer u. Riecke, Mitteil. d. landwirtsch. Inst. in Breslau 2 (1902/04) 295, 304; Ref. in Zeitschr. f. anal. Chem. 43 (1904) 70, 71.

⁸⁾ Dormeyer, Zeitschr. f. anal. Chem. 36 (1897) 279.

Betonung der Bedeutung zu beschließen, welche dieses Gebiet für den verschiedensten Disziplinen angehörenden Analytiker besitzt. Aus der im vorigen gegebenen Uebersicht der mannigfaltigen, in ihrer Entwicklungsfähigkeit noch nicht einmal ganz abzuschätzenden Anwendungen, deren der Nachweis und die Bestimmung der Proteasen selbst wie auch des durch dieselben angegriffenen Substrates fähig ist, geht dies zur Genüge hervor.

Die Koagulasen.

Drei Enzyme, von denen sich wenigstens zwei aus den im folgenden ausgeführten Gründen den Proteasen anreihen lassen, werden wegen der gemeinsamen Eigentümlichkeit, Koagulationen zu bedingen unter dieser Bezeichnung zusammengeschlossen. Es sind: das Labenzym (die Chymase oder Chymosin), das Fibrinferment (die Thrombase) und die Muzin zur Gerinnung bringende Muzinase¹⁾.

Die Pektinstoffe zur Gerinnung veranlassende Pektase ist dagegen im Kapitel über die Karbohydrasen abgehandelt worden.

Das Labferment.

Historisches: Dieses von Alexander Schmidt²⁾, Hammarsten³⁾ und Heintz⁴⁾ entdeckte Enzym tritt dadurch hervor, daß die schon im Altertum bekannte und in jenen frühen Zeiten wie heutzutage zur Bereitung von Käse benutzte⁵⁾ süße Gerinnung von Milch an seine Gegenwart geknüpft ist. Zahlreiche antike Literaturangaben⁶⁾ zeigen die große Verbreitung, die der Feigensaft als laben-

¹⁾ Ueber die Muzinase der Dünndarmschleimhaut siehe Roger, *Compt. rend. Soc. Biol.* 59 (1905) 428; Ciaccio, *Ebenda* 60 (1906) 675, fand sie auch in anderen Organen. Trémollières u. Riva, *Ebenda* 60 (1906) 690, stellten Muzinase im Blut bei verschiedenen Krankheiten fest. Nach Nepper u. Riva, *Ebenda* 60 (1906) 361, 362, findet sie sich auch im Kot.

²⁾ A. Schmidt, *Beitr. zur Kenntnis d. Milch*, Dorpat 1871.

³⁾ Hammarsten, *Autoref. in Malys Jahrb.* 1 (1872) 118; 3 (1874) 135; 6 (1877) 158.

⁴⁾ Heintz, *Journ. f. prakt. Chem. [N. F.]* 6 (1872) 374.

⁵⁾ Siehe darüber auch Peters, *Ueber das Labferment*, Dissert., Rostock 1894; Bang, *Ergebn. d. inneren Medizin* 9 (1912) 435.

⁶⁾ Homer, *Ilias* V, 902; Dioskorides, *Materia medica* I, 183; Aristoteles, *H. a.* III, 20; *Meteorolog.* IV, 7; Theophrastus, *Caus. plant.* I, 16, 7; Plutarch, *Symposiac.* 6, 10; Plinius, *Natur. historia* XVI, 72, XXIII, 63, 64; zitiert nach der Inaug.-Dissert. der Universität Bern von Herdi, *Die Herstellung*

des Agens bei Griechen und Römern gefunden hat. Außer dem Umrühren der Milch mit frisch abgebrochenen Feigenzweigen, über welche Methode Columella¹⁾ sich folgendermaßen äußerte: „Nec dubium, quin fici ramulis glaciatus caseus incundissime sapiat“, wurde Watte, die mit dem der angeschnittenen Rinde entquollenen Feigen-saft getränkt war, in die Milch eingelegt. Außerdem kamen das ächte Labkraut²⁾, Artischocken (*Cynara*), wie auch Carduus- und Cnecusblüten- und Samen bei den Alten in Anwendung³⁾. Trotz der großen Verbreitung pflanzlicher Labe im klassischen Altertum wurde schon zu jenen Zeiten tierischem Lab der Vorzug gegeben, und zwar handelte es sich vor allem um die geronnene Milch aus dem Lab-magen junger Lämmer und Ziegen, sowie dem Hasenlab⁴⁾, erst später auch um Schleimhaut des tierischen Verdauungstraktus, und zwar merk-würdigerweise um die Schleimhaut aus den Eingeweiden des Huhns⁵⁾.

Die Labgerinnung hat nichts mit der Milchsäurebildung zu tun, wie dies Berzelius angenommen hatte, während Liebig die Alkalibindung durch die entstehende Säure als Ursache der Koagu-lation betrachtete. Bei der eminent hemmenden Wirkung, welche Hydroxylionen — auch diejenigen der Milch (siehe im folgenden) — auf die Gerinnung ausüben, steckte in der Auffassung von Liebig zweifellos ein richtiger Kern. Nichtsdestoweniger wurde dieselbe von Selmi⁶⁾ durch den Nachweis der Milchgerinnung in alkalischer Lö-sung widerlegt. Damit fiel zugleich eine andere, ältere Annahme, welche eine Beteiligung der Magensäure bei dieser Art Koagulation zur Voraussetzung hatte.

Theoretisches über das Labferment.

Beziehungen zwischen Lab- Pepsin- und Trypsin-wirkung. Im Gegensatz zu den andern Vorstellungen blieb die alte

und Verwertung von Käse im griechisch-römischen Altertum, Frauenfeld 1918, S. 31—34; Else Strantz, Zur Sulphionfrage, 1909, Anhang 2; Euripides, *Cycl.* 136; Aristophanes, *Vesp.* 353.

¹⁾ Columella, VII, 8, 1, 2.

²⁾ Dioskorides, *Materia medica* IV, 94.

³⁾ Dioskorides, *Materia medica* IV, 187; Columella VII, 8, 1; Geopon. XVIII, 19, 2.

⁴⁾ Ovid, *Metamorph.* XIII, 829; Aristoteles, *H. a.* III, 20; Plinius, *Natur. historia* XI, 96; Columella VII, 8, 1.

⁵⁾ Pallad. VI, 9, 1; Geopon. XVIII, 19, 2, zitiert nach Herdi, loc. cit. Fußnote 6 vorige Seite, S. 32 u. 33.

⁶⁾ Selmi, *Journ. Pharm. Chim.* [3] 9 (1846) 265.

Ansicht, welche die labende Wirkung dem Pepsin zuschrieb, unwiderlegt und feierte in den Ergebnissen der neuesten Forschung ihre Wiederauf-
erstehung ¹⁾. Der innere Mechanismus der Labwirkung, welcher mit der
Umwandlung des Kaseins in Parakasein und sekundär ²⁾ der Ausfällung die-
ses Kolloids durch die entgegengesetzt geladenen zweiwertigen Kalzium-
ionen zum isoelektrischen Gerinnsel, dem Parakaseinkalk (das den Käse
darstellt), einhergeht ³⁾, charakterisiert sich nämlich im wesentlichen
als eine Spaltung, indem nach den Untersuchungen von Hammar-
sten ⁴⁾, Köster ⁵⁾, Müller ⁶⁾, Rotondi ⁷⁾, Laqueur ⁸⁾, Petry ⁹⁾,
Spiro ¹⁰⁾, Slowtsoff ¹¹⁾, Schmidt-Nielsen ¹²⁾, Fuld ¹³⁾, van
Herwerden ¹⁴⁾, Friedheim ¹⁵⁾ und Engel ¹⁶⁾ das Kasein eine
Spaltung in Parakasein und die sog. Molkenalbumose ¹⁷⁾, die jeden-
falls als ein Gemisch verschiedener Eiweißabbaustufen zu betrachten
ist ¹⁸⁾, erleidet. Absolut sicher ist dies zwar nicht erwiesen, da Hill-

¹⁾ Siehe im folgenden.

²⁾ Arthus u. Pages, *Archive Physiol.* [5] 2 (1890) 330, 540; siehe auch
Laqueur, loc. cit. Fußnote 8, diese Seite.

³⁾ Schloßmann u. Engel, *Oppenheimers Handb. d. Biochem.* 3.
1. Hälfte, S. 405.

⁴⁾ Hammarsten, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 22 (1896) 103.

⁵⁾ Köster, *Upsala läkaref. förh.* 16, 514; siehe *Malys Jahrb.* 11 (1881) 14.

⁶⁾ Müller, *Archiv f. Hygiene* 44 (1902) 126.

⁷⁾ Rotondi, *Monatsschr. f. Kinderheilkunde* 2 (1904) 595.

⁸⁾ Laqueur, *Ueber das Kasein als Säure und seine Unterscheidung
gegen das durch Lab veränderte (Parakasein). Theorie der Labgerinnung*,
Dissert., Breslau 1905; Hofmeisters Beitr. 7 (1905) 273; *Biochem. Zentralbl.* 4
(1905) 334.

⁹⁾ Petry, *Hofmeisters Beitr.* 8 (1906) 339.

¹⁰⁾ Spiro, *Hofmeisters Beitr.* 8 (1906) 365.

¹¹⁾ Slowtsoff, *Hofmeisters Beitr.* 9 (1907) 149.

¹²⁾ Schmidt-Nielsen, *Hofmeisters Beitr.* 9 (1907) 322.

¹³⁾ Fuld, *Hofmeisters Beitr.* 10 (1907) 123; *Biochem. Zeitschr.* 4 (1907) 488.

¹⁴⁾ van Herwerden, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 52 (1907) 184, vertritt
im Gegensatz zu den übrigen die Auffassung, daß die Hydrolyse des Kaseins
ein komplizierterer Vorgang sei, eine Annahme, die vielleicht eine Stütze für die
von der Verfasserin ins Auge gefaßte Möglichkeit bietet, daß es sich bei den
ersten Phasen der Eiweißspaltung überhaupt nicht um eine Hydrolyse, sondern
um eine Depolymerisation handeln könnte.

¹⁵⁾ Friedheim, *Biochem. Zeitschr.* 19 (1909) 132.

¹⁶⁾ Engel, *Münchener med. Wochenschr.* (1910) 630.

¹⁷⁾ Bei schneller Koagulation fand Couvreur, *Soc. Biol.* 69, 579, 70 (1911)
23, keine Albumose im Filtrat.

¹⁸⁾ Siehe Spiro, loc. cit.; Petry, loc. cit.; Slowtsoff, loc. cit. und
van Herwerden, loc. cit. diese Seite, Fußnoten 10, 9, 11, 14.

mann¹⁾ die gleiche Quantität eines von ihm als Parakasein angesprochenen Niederschlags erhalten hat, als Kasein vorhanden war, ein Befund, der Hammarsten²⁾ an seiner eigenen Spaltungstheorie zweifeln machte. Loevenhart (loc. cit.) sowie Pawlow und Paratschuk³⁾ neigen sogar zu der der vorigen entgegengesetzten Auffassung, wonach das Parakasein als das komplexer gebaute Molekül zu betrachten wäre, als ein Produkt fermentativer Synthese (Plasteinbildung)⁴⁾. Doch fallen diese wenigen Angaben neben der Fülle der gegenteiligen Äußerungen kaum ins Gewicht, um so weniger, als Allemann und W. Müller⁵⁾ den von ihnen bestätigten Befund von Hillmann mit dem Eingehen von Albumin, vielleicht auch von Molkeneiweiß, in den Parakaseinniederschlag in Zusammenhang gebracht haben. (Dazu käme im Falle einer hydrolytischen Spaltung⁶⁾ noch die von niemand berücksichtigte Gewichtszunahme des Niederschlags durch die Wasserfixierung.) Die um 12–24 % geringere innere Reibung des Parakaseins⁷⁾ und die mit dem Uebergang des Kaseins in diese Substanz parallel gehende Zunahme des osmotischen Drucks⁸⁾ läßt sich ebenfalls nur mit einer Spaltung, nicht aber mit einer Vergrößerung oder einer Unveränderlichkeit des Moleküls in Einklang bringen⁹⁾. Ferner würde die durch Kalziumsalze aufzuhebende Hemmungswirkung, welche die Albumosen auf den Gerinnungsprozeß ausüben¹⁰⁾, zugunsten der Annahme anzuführen sein, daß

¹⁾ Hillmann, Mitteil. d. landwirtsch. Inst. d. Universität Leipzig (1897) 113; Milch-Ztg. 25 (1896) 86.

²⁾ Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28 (1899) 93.

³⁾ Pawlow u. Paratschuk, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42 (1904) 415.

⁴⁾ Siehe demgegenüber Sawjalow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46 (1905) 307.

⁵⁾ Allemann u. W. Müller, Milchwirtsch. Zentralbl. 40 (1911) 389.

⁶⁾ Ueber eine andere, bisher noch nicht diskutierte Spaltungsart des Eiweiß, vergl. Fußnote 14, vorige Seite und im folgenden.

⁷⁾ Laqueur, loc. cit. Fußnote 8 vorige Seite.

⁸⁾ A. Mayer, Landwirtsch. Versuchsstat. 27 (1882) 247; Fuld, Hofmeisters Beitr. 2 (1902) 170.

⁹⁾ Es sei an dieser Stelle daran erinnert, daß sich Herzog u. Kasarowski, loc. cit., durch Messung der Diffusionskonstanten der kolloiden Fermentlösungen über das Molekulargewicht der Fermente orientiert haben, da nach Thovers, Compt. rend. 135 (1902) 579, 150 (1910) 270, schon früher erwähnten Untersuchungen die Beziehung gilt:

$$M = \frac{59,2}{D^2},$$

worin M das Molekulargewicht und D den gemessenen Diffusionskoeffizienten bedeutet. Einstein, Zeitschr. f. Elektrochem. 14 (1908) 235, hat gerade die Diffusionskoeffizienten zur Berechnung der durchschnittlichen Teilchengröße gelöster Kolloide herangezogen.

¹⁰⁾ Fuld u. Spiro, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31 (1900) 182.

die Umwandlung des Kaseins in Parakasein ein Spaltprozeß ist, welcher zur Bildung von Albumosen führt, die dann als Endprodukte zur Entfaltung einer spezifischen Hemmungswirkung befähigt sind. Doch mahnen die Angaben von Gley¹⁾ und Locke²⁾, daß bei dieser Hemmungswirkung³⁾ der sekundäre Gerinnungsprozeß betroffen sei, zur Vorsicht, denn eine Hemmung auf dieser Grundlage kommt natürlich als Beweis für die Proteolyse nicht in Frage. Weiter kann auch der von Reichel und Spiro⁴⁾, Fuld und Pincussohn⁵⁾ sowie Bezzola⁶⁾ festgestellte, gemäß dem Verteilungssatz sich vollziehende Uebergang von Lab in den Parakaseinniederschlag, hier herangezogen werden. Vor allem weist aber die Beobachtung einer während und nach der Gerinnung fortschreitenden Spaltung⁷⁾ des Parakaseins, verbunden mit dem von van Dam⁸⁾ aufgefundenen Parallelismus der gerinnenden und der Parakasein verdauenden Wirkung des Labs, — wobei sich Proportionalität der Verdauungsgeschwindigkeit und der Wasserstoffionenkonzentration bis zu $1,4 \cdot 10^{-5}$ ergab — unbedingt auf eine proteolytische Spaltung hin. Es ist die Proteolyse wie bei den entsprechenden Pepsinbestimmungsmethoden denn auch von van Dam⁹⁾ als Basis für die Bestimmung des Wirkungswertes von Handelslab gewählt worden.

Die Methode läuft darauf hinaus, nach 24stündiger Verdauung bei der durch Azetate hergestellten Wasserstoffionenkonzentration von 10^{-5} , bei der Temperatur von 30°, den in Lösung gegangenen Stickstoff im Filtrat nach Kjeldahl zu bestimmen. Die Berechnung erfolgt wie beim Pepsin auf Grund des quadratischen Abhängigkeitsverhältnisses, wobei als Vergleichsobjekt ein Normallab von der festgesetzten Stärke 100 000 dient. Als Normallab wird ein solches Labpräparat angenommen, das unter den angegebenen Versuchs-

¹⁾ Gley, Soc. Biol. 48 (1896) 591.

²⁾ Locke, Journ. experim. Med. 2 (1897) 493

³⁾ Ueber die Hemmungswirkung der der proteolytischen Spaltung entgegenarbeitenden Antifermente siehe Jacoby, Biochem. Zeitschr. 1 (1906) 53, 34 (1911) 485; Herzog, Zeitschr. f. physiol. Chem. 60 (1909) 306.

⁴⁾ Reichel u. Spiro, Hofmeisters Beitr. 5 (1904) 68; 7 (1905) 479.

⁵⁾ Fuld u. Pincussohn, Biochem. Zeitschr. 9 (1908) 318.

⁶⁾ Bezzola, Clin. med. ital. (1905) Heft 6; Biochem. Zentralbl. 4 (1906) 1709.

⁷⁾ Vgl. Petry, loc. cit. Fußnote 9, S. 256; Slowtzoff, loc. cit. Fußnote 11, S. 256; Schmidt-Nielsen, loc. cit. Fußnote 12, S. 256, und vor allem die Theorie von Babcock u. Russell, Zentralbl. f. Bakt. 3 (1897) 615, 6 (1900) 17, wonach das Lab bei der Käseerzeugung eine Rolle spielt.

⁸⁾ van Dam, Zeitschr. f. physiol. Chem. 61 (1909) 147.

⁹⁾ van Dam, Landwirtsch. Versuchsstat. 78 (1912) 193.

bedingungen so viel löslichen Stickstoff ergibt, daß 26,5 ccm normale Säure verbraucht werden.

Mit dem Nachweis der fortschreitenden Parakaseinspaltung ist zugleich die Auffassung erledigt, daß das Parakasein nur Nebenprodukt und nicht Zwischenprodukt des Kaseinabbaus durch Lab wäre, eine Auffassung, für welche ins Feld geführt werden konnte, daß Zuntz und Sternberg ¹⁾ sowie Hawk ²⁾ das gelabte Milcheiweiß schlechter verdaulich fanden als das genuine ³⁾. Es hätte der weitere Abbau des Kaseins, wenn diese Annahme richtig gewesen wäre, dann vornehmlich über die Molkenalbumose gehen müssen. Demgegenüber hatten Tobler ⁴⁾, Abderhalden und Kramm ⁵⁾ sowie Sahli ⁶⁾ die Ansicht ausgesprochen, daß das Parakasein Zwischenprodukt des Kaseinabbaus ist. Sie haben somit den den Anschauungen von Zuntz, Sternberg und Hawk entgegengesetzten Standpunkt vertreten. Sahli stützte sich hierbei auf die Arbeiten von Moritz und seine eigenen Beobachtungen ⁷⁾. Danach hätte die Sedimentierung, welche Sahli außer beim Kasein auch beim Hühnereiweiß ⁸⁾ konstatierte (womit zugleich die spezifische Einstellung des Labs auf Kasein, die gleichbedeutend mit der Ausbildung einer besonderen Kasease ⁹⁾ wäre, eine Einschränkung erfährt), den physiologischen Sinn, daß das einzige in größeren Quantitäten genossene flüssige Nahrungsmittel der spaltenden Wirkung des Magensaftes lange genug ausgesetzt bleibt, um vom Organismus voll ausgenutzt zu werden ¹⁰⁾.

Der Nachweis, daß der Einfluß des Labferments auf einen Eiweißspaltprozeß hinausläuft, stellt nun aber, wie schon angedeutet wurde, dieses Enzym in eine Reihe mit den Proteasen, und nicht genug damit, es stellt sich die weitere Frage, ob sich das Chymosin nicht direkt mit den schon besprochenen proteolytischen Enzymen identifizieren läßt. Mit anderen Worten, man kann die Fragen stellen: Ist die Labwirkung nur als eine schwache Pepsin- oder Trypsinspaltung, als die erste schon bei neutraler Reaktion sich vollziehende Phase der Ei-

¹⁾ Zuntz u. Sternberg, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1900) 362.

²⁾ Hawk, Journ. Physiol. 10 (1904) 37.

³⁾ Siehe auch Gaucher, Compt. rend. 148 (1909) 53.

⁴⁾ Tobler, 23. Versamml. d. Gesellsch. f. Kinderheilkunde (1906) 144, (1907) 411; Ergebn. f. inn. Medizin 1, 495.

⁵⁾ Abderhalden u. Kramm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 77 (1912) 462.

⁶⁾ Sahli, Lehrb. d. klin. Untersuchungsmethoden, Leipzig u. Wien 1913, S. 627.

⁷⁾ Sahli, loc. cit. S. 656 ff., vorige Fußnote.

⁸⁾ Ueber eine eventuelle Gerinnung von Nukleoalbuminen s. Raudnitz, Ergebn. d. Physiol. [1] 2 (1903) 193.

⁹⁾ Siehe hierzu Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, Bd. 2, 1913, S. 558, der an die behauptete kaseinspaltende Wirkung der Peptasen (Bang, loc. cit.) erinnert.

¹⁰⁾ Vgl. damit die für die agglutinierende bzw. präzipitierende Wirkung des lytischen Immunkörpers im folgenden vertretene Auffassung.

weißverdauung¹⁾ zu betrachten, und fällt diese Verdauung bloß bei dem Kasein als etwas Besonderes in die Augen, weil hier ein Zwischenprodukt der Spaltung²⁾, das Parakasein, entsteht, welches sich durch die zufällige Eigentümlichkeit eines außerordentlich großen Koagulationsvermögens verrät?

So ist Parakasein leichter fällbar durch Kalziumsalze auch ohne die Gegenwart von Lab³⁾ und leichter aussalzbar durch Kochsalz und Ammoniumsulfat⁴⁾, auch wird es leichter durch Alkohol und Säuren gefällt als das Kasein.

Es kann wohl keinem Zweifel unterliegen, daß ohne diese mit der abbauenden Wirkung des Labferments nur indirekt zusammenhängende Nebenerscheinung der Koagulation eines Eiweißspaltproduktes der ganze Sturm gegeneinander ankämpfender Ideen niemals entfacht worden wäre; denn über die Einheitlichkeit oder Nicht-einheitlichkeit des Trypsins, die von mindestens ebenso großer Bedeutung ist, haben sich die Gemüter nicht sonderlich erhitzt. In der obigen, von der gewöhnlichen etwas abweichenden Fassung des unitarischen Gedankens scheint mir, daß die gestellte Frage in zustimmendem Sinn beantwortet werden kann. Denn von der Pepsin- wie von der Labwirkung ist bekannt, daß das Agens, welches Träger derselben ist, die gleiche Bildungsstätte in den Fundusdrüsen der Magenschleimhaut besitzt. Bei der Angabe von Glaeßner⁵⁾ über eine verschiedene räumliche Verteilung der Proenzyme in der Magenschleimhaut ist die fehlende Azidität im Pylorusteil und die Gegenwart von Erepsin in Betracht zu ziehen, wozu letzteres, wenn sich die Angaben bestätigen, daß dasselbe Kasein anzugreifen vermag⁶⁾, eine der Eiweißspaltung entsprechende labende Wirkung ausüben muß, die von dualistischer Seite sogar als die Wirkung des echten Labs angesprochen worden ist⁷⁾. Ferner ist bekannt, daß das Agens bei der Pepsin- wie bei der Labwirkung aus einer Vorstufe, dem Zymogen⁸⁾, welches hier wie dort in Form von kleinen Körnchen in den Hauptzellen abgelagert wird, unter dem Einfluß derselben Aktivatoren, insbesondere

¹⁾ Sawjalow, Zeitschr. f. physiol. Chem. **46** (1905) 307; Gewin, Ebenda **54** (1907) 32; Over de verhouding van Pepsin tot Chymosin, Dissert., Oktober 1907.

²⁾ Ueber die Auffassung der Umwandlung von Kasein in Parakasein als Teileffekt des Eiweißabbaus vgl. Mellanby, Journ. Physiol. **45** (1912) 345.

³⁾ Raudnitz, Spiro-Ashers Ergebn. d. Physiol. **2** (1903) 193.

⁴⁾ Loevenhart, Zeitschr. f. physiol. Chem. **41** (1904) 177; Laqueur, loc. cit. Fußnote 8, S. 256.

⁵⁾ Glaeßner, Hofmeisters Beitr. **1** (1901) 27.

⁶⁾ Vgl. Fußnote 9, vorige Seite.

⁷⁾ Bang, Ergebn. f. inn. Medizin **9** (1912) 435.

⁸⁾ Grützner, Pflügers Archiv **16** (1878) 118.

der Salzsäure, in die aktive Form ¹⁾ übergeht ²⁾ und daß chemische Substanzen, z. B. Alkalien ³⁾, Serum- ⁴⁾ und Askariden ⁵⁾-Antitrypsine, sowie physikalische Eingriffe wie Dialyse ⁶⁾, Filtration (durch Kolloidum) ⁷⁾, Diffusion ⁸⁾ und Temperaturänderungen ⁹⁾ usw. die beiden Wirkungen in analoger Weise beeinflussen ¹⁰⁾.

Dieselben Analogien gelten auch zwischen Trypsin und Chymosin ¹¹⁾. Nur der durch Enterokinase aktivierte Pankreassaft vermag auf Kasein wie auf anderes Eiweiß einzuwirken ¹²⁾.

Faktoren welche den Lab- und Pepsineffekt eines Magensaftes verschieben. Hammarsten ¹³⁾, der Hauptverfechter des dualistischen Standpunktes ¹⁴⁾, hat gezeigt, daß die im vorigen besprochene Parallelität auch fehlen kann, indem er bei Magensäften geringe labende und starke proteolytische Wirkung und umgekehrt auffand, und solche Differenzen künstlich so stark zu steigern

¹⁾ Hedin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 72 (1911) 187, hat demgegenüber die Auffassung vertreten, daß das Labzymogen fertiges Lab in Gegenwart eines mit demselben zugleich sezernierten, artspezifischen Hemmungskörpers sei, der durch Salzsäure zerstört werde.

²⁾ Lörcher, Pflügers Archiv 69 (1898) 183.

³⁾ Tichomirow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55 (1908) 107.

⁴⁾ Briot, Soc. Biol. 64 (1908) 369; siehe auch Derselbe, Compt. rend. 128 (1899) 1359; Etudes sur la présure, Thèse Paris 1900, sowie Röden, Malys Jahrb. 17 (1887) 160; Sellier, Soc. Biol. 60 (1906) 316. Nach Briot, loc. cit. u. Schern, Biochem. Zeitschr. 20 (1909) 231, finden sich labhemmende Stoffe auch in der Milch, insbesondere von kranken Kühen [Jacoby, Biochem. Zeitschr. 1 (1906) 53].

⁵⁾ R. O. Herzog, Zeitschr. f. physiol. Chem. 60 (1909) 306.

⁶⁾ Jacoby, loc. cit. Fußnote 4, diese Seite.

⁷⁾ Funk u. Niemann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 68 (1910) 263.

⁸⁾ R. O. Herzog, loc. cit. Fußnote 5, diese Seite.

⁹⁾ Sawitsch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55 (1908) 84; Jacoby, loc. cit. Fußnote 4, diese Seite.

¹⁰⁾ Pawlow u. Parastschuk, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42 (1904) 415; Blum u. Boehme, Hofmeisters Beitr. 9 (1906) 74; Wohlgemuth u. Röder, Biochem. Zeitschr. 2 (1907) 421.

¹¹⁾ Vernon, Journ. Physiol. 29 (1903) 302; Pawlow, loc. cit. vorige Fußnote.

¹²⁾ Délézenne, Soc. Biol. 63 (1907) 98, 187; Wohlgemuth, Biochem. Zentralbl. 2 (1907) 350.

¹³⁾ Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 56 (1908) 18, 68 (1910) 119, 74 (1911) 142.

¹⁴⁾ Siehe auch Schmidt-Nielsen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48 (1906) 92; Vidensk. Skrifter, I. Math.-naturw. Kl., Christiania (1908) 9; Biochem. Zentralbl. 7, 1862; Glaeßner, Hofmeisters Beitr. 1 (1901) 1.

vermochte, daß Präparate mit ausschließlich labendem¹⁾ und Präparate mit vorwiegend proteolytischem Einfluß resultierten. So ließ sich aus Magensäften durch Magnesiumkarbonat oder durch Erzeugung eines Kaseinniederschlags der Träger der proteolytischen Wirkung mitreißen, und das Filtrat zeigte dann ausschließlich oder fast ausschließlich nur noch Labwirkung. Dies kann aber auch einfach daher rühren, daß infolge der starken Herabsetzung der Fermentkonzentration die Eiweißspaltung nicht über die erste Phase hinausgeht.

Sinkt die Fermentkonzentration noch weiter, oder verringert man die Menge der gerinnungsbeschleunigenden Kalksalze, so beobachtet man die von Roberts²⁾ als Metakaseinreaktion bezeichnete und von ihm dem Trypsin zugeschriebene Erscheinung, daß Parakasein erst beim Erhitzen ausfällt, ein Phänomen, das in der Folge Edkins³⁾ mit einer schwachen Labwirkung in Zusammenhang gebracht hat.

Auch auf anderem Wege läßt sich durch Fermentzerstörung die tiefgreifende Eiweißspaltung unterdrücken, während die beginnende Spaltung, wie sie sich in der Labwirkung dokumentiert, noch nachweisbar ist. Burge⁴⁾ erzielte dies mittels Durchleiten eines elektrischen Stroms von 10 Milliampere. Nach 25 Stunden zeigte die so behandelte Pepsin-Lablösung bei erhaltener Labwirkung keine Pepsinwirkung mehr.

Auch die übrigen Ergebnisse lassen sich in anderer Weise als durch die Annahme zweier prinzipiell verschiedener Enzyme Pepsin und Lab deuten⁵⁾, wenn man die Anpassungsfähigkeit der Verdauungsfermente an die Qualität der zu verarbeitenden Nahrung⁶⁾ und die Möglichkeit eines verschiedenen Verhaltens der Proteasen im Früh- und Spätverlauf der Verdauung (siehe im folgenden) berücksichtigt. Nur der Magensaft solcher Arten oder Individuen, deren Nahrung normalerweise Kasein enthält, wird die von Pawlows Schülern, Sawjalow⁷⁾, Gewin⁸⁾, Sawitsch⁹⁾ u. a.¹⁰⁾ postulierte Parallelität im

¹⁾ Siehe auch Porter, Journ. Physiol. 42 (1911) 339; van Hasselt, loc. cit. Fußnote 4. folgende Seite.

²⁾ Roberts, Proc. Royal Soc. London 29 (1879) 157, 32 (1881) 145.

³⁾ Edkins, Journ. Physiol. 12 (1891) 193.

⁴⁾ Burge, Amer. Journ. Physiol. 29 (1912) 330.

⁵⁾ Gley, Soc. Biol. 48 (1896) 591; Locke, Journ. of exp. med. 2 (1897) 433.

⁶⁾ Siehe über die neuerdings wieder in Zweifel gezogene Laktasebildung durch Anpassung an den Milchzucker der Nahrung den *Allg. Teil* S. 259 u. 260, und diesen Band im Abschnitt über die Laktase.

⁷⁾ Sawjalow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46 (1905) 307.

⁸⁾ Gewin, Over de verhouding van Pepsin tot Chymosin, Dissert. 1907; Zeitschr. f. physiol. Chem. 54 (1907) 32.

⁹⁾ Sawitsch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55 (1908) 84, 68 (1910) 12; Migay u. Sawitsch, Ebenda 63 (1909) 405.

¹⁰⁾ Zitiert bei Gewin, loc. cit. vorletzte Fußnote.

Verhalten des Pepsins gegenüber den ungleichartigen Eiweißkörpern aufweisen. Fehlt dagegen das Kasein, wie dies bei der Milch der Beutelratte der Fall ist, so erscheint es ganz natürlich, daß der Magensaft dieser Tiere nicht auf Kasein eingestellt ist und dementsprechend, wie Ducceschi¹⁾ fand, auch keine Labwirkung besitzt. Die gegenüber dem normalen Nahrungseiweiß stattfindende proteolytische Spaltung bleibt eben gegenüber dem Kasein einfach aus²⁾. Das Gegenstück hierzu bildet der Magensaft von Tieren im Säuglingsalter. Da sich der Magensaft bei diesen im wesentlichen mit der Verarbeitung des Kaseins zu befassen hat, so stellt sich das Pepsin spezifisch auf dieses Substrat ein, und erst mit dem Hinzutreten anderer Eiweißkörper bei der gemischten Kost der späteren Lebensalter weicht die Spezifität gegenüber Kasein einer mehr oder weniger gleichmäßigen eiweißspaltenden Fähigkeit. Das Verhältnis des labenden Einflusses zur Pepsinwirkung eines Magensaftes dürfte also in erster Linie vom durchschnittlichen Kaseingehalt der Nahrung im Vergleich zum Gehalt an anderem Eiweiß abhängen. Tatsächlich haben denn auch Rakoczy³⁾ und van Hasselt⁴⁾ gefunden, daß die labende Wirkung des Kälbermagensaftes im Lauf der ersten Monate eine rasche Abnahme erfährt, während die Pepsinwirkung zunimmt. Da sich im übrigen der Magensaft von neugeborenen Pferden, Schweinen und anderen Tieren ebenso verhält wie derjenige des Kalbes, so ist zu erwarten, daß sich die immer wieder — und auch von Vertretern der Identitätstheorie beim erwachsenen Tier (Rakoczy, loc. cit.) — behaupteten Differenzen zwischen dem „Chymosin“ des Kälbermagens (und des sich gleich verhaltenden Chymosins des Schafmagens) gegenüber dem „Parachymosin“ (Bang) der anderen Tiere in der Hauptsache auf die Differenzen des Nahrungseiweißes des saugenden und des erwachsenen Tieres zurückführen lassen.

Daß der Träger der Pepsin- wie der Labwirkung bei den einzelnen Tieren nicht absolut übereinstimmend sei, hat zuerst Bang⁵⁾ angegeben. Das Parachymosin soll dem Labgesetz nicht unterworfen sein⁶⁾.

¹⁾ Ducceschi, Publ. de la Univ. nac. de Cordoba 1908; Arch. Fisiol 5 (1908) 413.

²⁾ Daß van der Leek, Bakteriolog. Zentralbl. [2] 17 (1906) 16; Biochem. Zentralbl. 6, 309, zwischen proteolytischer und Labwirkung bei den in bezug auf ihr Substrat so ungemein wählerischen Bakterien keinen Zusammenhang gefunden hat (über solche Zusammenhänge siehe jedoch im folgenden), darf daher ebenso wenig als Beweis gegen die unitarische Auffassungsweise betrachtet werden.

³⁾ Rakoczy, Zeitschr. f. physiol. Chem. 68 (1910) 421, 73 (1911) 453.

⁴⁾ van Hasselt, Zeitschr. f. physiol. Chem. 70 (1910) 171.

⁵⁾ Bang, Pflügers Archiv 79 (1900) 425.

⁶⁾ Vgl. dazu Becker, Hofmeisters Beitr. 7 (1906) 89; Briot, Soc. Biol. 62 (1907) 1229; Gerber, Ebenda 63 (1907) 575; Compt. rend. 147 (1908) 708.

Aber auch die Differenz der einzelnen Kaseine, deren Zusammensetzung untereinander um so größere Abweichungen zeigt, je entfernter die Verwandtschaft der Tiere ¹⁾ ist, deren Milch ein Kasein entstammt, kann schon auf die Anpassung der Verdauungsfermente von Einfluß sein. Die hierdurch bedingten Differenzen dieser letzteren kommen auch bei der immunisatorischen Erzeugung von Antilab ²⁾ zum Ausdruck, wie dies ja bei minimsten Unterschieden von eiweißhaltigen Materien eine häufig beobachtete Erscheinung ist ³⁾. So erwies sich nicht nur ein Immunserum gegen Phytochymase aus Artischocken (Cynarase) ⁴⁾ nach Morgenroth ⁵⁾ unfähig tierisches Lab zu hemmen, sondern nach v. Eißler ⁶⁾ vermag auch Antischweinlab nicht Kälberlab, und nach Hedin ⁷⁾ umgekehrt Antikälberlab nicht Schweine-, wie auch Pferde- lab zu hemmen. Ebenso fanden Moro ⁸⁾ und Briot ⁹⁾ eine viel stärkere Hemmungswirkung des Antikälberlabs gegenüber Kälberlab, als gegenüber Menschenlab.

Fehlt die Wirkung auf Kasein nicht ganz, aber ist sie immerhin bei einem Magensaft nur schwach entwickelt, während die Spaltungsfähigkeit gegenüber anderen Eiweißstoffen beträchtlich ist, so ist es ebenfalls durchaus verständlich, daß bei einer Schädigung der Protease, wie sie Hammarsten (loc. cit.) und Schmidt-Nielsen (loc. cit.) ¹⁰⁾

¹⁾ Burow, Beiträge zur Entscheidung der Frage, ob die Kaseine verschiedener Tierarten identisch sind, Inaug.-Dissert., Basel 1905.

²⁾ Morgenroth, Zentralbl. f. Bakteriologie. **27** (1900) 721, konnte mit einem Labimmunserum bis herab zu einem Gehalt der Milch von nur 2% an diesem Zusatz deren Gerinnung hemmen, wenn der Fermentgehalt nicht mehr als 1 : 20000 betrug. Ohne Antilab koagulierte die Milch noch bei der Fermentverdünnung von 1 zu 3 Millionen. In Gegenwart des Antilabs mußte eine 200fach größere Fermentmenge angewendet werden, um die Milch zur Koagulation zu bringen, als ohne die Gegenwart des Antiferments.

³⁾ Die über 300 biologischen Arten des Streptokokkus, denen Besonderheiten der Antikörper entsprechen, sind nur ein Beispiel von vielen.

⁴⁾ Rosetti, Chem. Zentralbl. (1899) 1, 131.

⁵⁾ Morgenroth, Zentralbl. f. Bakteriologie. **26**, 349, 27, 721. Siehe ferner die analoge Beobachtung von Javillier, Contribution à l'état de la présure chez les végétaux, Thèse Paris 1903, bei Lolium- und Luzernenantilab.

⁶⁾ v. Eißler, Sitzungsber. d. Wiener Akad. **114** (1905) 119.

⁷⁾ Hedin, Zeitschr. f. physiol. Chem. **77** (1912) 229; siehe ferner Derselbe, Ebenda **60**, 85, 364, **63** (1909) 143, **74** (1911) 242, **76** (1912) 355.

⁸⁾ Moro, Zentralbl. f. Bakteriologie. **37** (1904) 485.

⁹⁾ Briot, Journ. Physiol. Pathol. gén. **9** (1907) 784; Compt. rend. **144** (1907) 1164.

¹⁰⁾ Siehe auch dessen Arbeiten über Labschädigung durch ultraviolette Strahlen [Hofmeisters Beitr. **5** (1904) 355; Zeitschr. f. physiol. Chem. **58** (1908) 233, sowie Hertel, Zeitschr. f. allg. Physiol. **4** (1904) 1].

durch Erhitzen auf 40° durchgeführt haben, die ohnehin schwache Wirkung auf das Kasein beim Verdünnen zuerst verschwindet, während anderseits bei einem Magensaft, der auf Kasein besser eingestellt ist, als auf ein anderes Nahrungseiweiß (der also nach der dualistischen Bezeichnungsweise mehr Lab enthält als Pepsin), die Kaseinspaltung durch eine Fermentschädigung nicht in dem Maß betroffen wird, wie die Spaltung der anderen Eiweißstoffe. In diesem Fall kann die Lösung ausschließlich Labwirkungen zeigen. Gegen diese Auffassung würde erst der nach den Untersuchungen von van Dam, welcher völligen Parallelismus zwischen Kaseinverdauung und Geschwindigkeit der Kaseingerinnung erwiesen hat, sehr unwahrscheinliche Nachweis sprechen, daß eine Pepsinspaltung des reinen Kaseins durch einen Magensaft stattfindet, ohne daß derselbe Milch zu laben vermag. Doch würde dann immer noch die zweite, im folgenden erörterte Möglichkeit zugunsten der unitarischen Theorie herangezogen werden können. Auch müßte, wie mir scheint, vor allem in Betracht gezogen werden, daß gerade Magensäfte mit starker Pepsinwirkung so rasch verdauen könnten, daß das Parakasein eine Weiterspaltung zu nicht mehr koagulablen Eiweißspaltprodukten erleidet, ehe es Zeit gefunden hat, sich in der zur Koagulation notwendigen Konzentration in der Lösung anzureichern. Mit dem Fehlen des in der Gerinnung gegebenen Indikators auf die Parakaseinbildung würde sich die der Labwirkung entsprechende erste Phase des Verdauungsvorgangs der Beobachtung entziehen, obschon der Prozeß seinen normalen Ablauf über Parakasein als Zwischenprodukt genommen hat. Die Fixierbarkeit oder Nichtfixierbarkeit dieses Zwischenproduktes wäre also hier wie überall eine Frage der Reaktionsgeschwindigkeit. Doch handelt es sich nicht so sehr um die absolute Reaktionsgeschwindigkeit der Pepsinverdauung, wie um die relative, d. h. um den Vorsprung, den der proteolytische Hauptprozeß vor dem Einsetzen des sekundären Gerinnungsvorgangs besitzt. Ist die Gerinnung erst ausgelöst, so wird sie sich infolge ihres fast momentanen Ablaufs als Labwirkung dokumentieren, solange noch ein bestimmtes Minimum an Parakasein vorhanden ist. Gestützt auf diese Ueberlegungen bieten sich die im folgenden näher ausgeführten Möglichkeiten, „Lab- und Pepsingehalt“ eines Präparates irgendwelcher Provenienz zu verschieben, mit den beiden Grenzfällen, bei denen nur die eine Wirkung sichtbar wird.

Es kann zunächst die Reaktionsgeschwindigkeit des proteolytischen Hauptprozesses durch Aenderung der Temperatur und der Reaktion des Mediums variiert werden. Wirken beide Faktoren gleich-

sinnig, wird also z. B. die Salzsäurekonzentration bis zum Optimum vermehrt — das mit der Tierart variiert, von der der zu prüfende Magensaft bzw. das daraus hergestellte Präparat stammt — und gleichzeitig die Temperatur ebenfalls bis zum Optimum erhöht, so bedeutet dies eine Verschiebung zugunsten der tiefergehenden Pepsinspaltung, und van Dam ¹⁾ konnte sogar unter diesen Voraussetzungen entsprechenden Versuchsbedingungen (beim Digerieren von nach Pekelharing gereinigtem Schweinepepsin mit 0,2%iger Salzsäure) die Gerinnung hemmen. Dagegen trat die labende Wirkung sofort wieder zutage, als das Präparat der Dialyse und der Fällung mit Ammonsulfat unterworfen wurde. Eine Steigerung der labenden Wirkung um das annähernd tausendfache zeigte nach van Hasselt (loc. cit.) ein der Dialyse und Kochsalzausfällung unterworfenen Kalbsmagenpräparat. Den reaktivierenden Einfluß hätte aber die Dialyse auch umgekehrt nach Pekelharing ²⁾ bei einem Labpräparat entfaltet, welches seiner pepsinspaltenden Fähigkeiten beraubt worden war. Van Dam erklärte den Einfluß der Dialyse und der Ammonsulfatfällung mit einer Beseitigung von Hemmungsstoffen, wie überhaupt das Vorhandensein oder Fehlen von Hemmungsstoffen, sei es der Lab- oder der Pepsinwirkung, bei den Unitariern in fast zu einseitiger Weise herangezogen wird, um die Argumente der Dualisten zu entkräften. Damit arbeiten sie aber nicht selten mit einer völlig Unbekannten, für deren Vorhandensein die Beweise fehlen. Vielleicht wäre es möglich, da und dort den Gedanken der Hemmungsstoffe auf eine breitere Basis zu stellen, d. h. alle jene Faktoren zu berücksichtigen, die eben auf die Reaktionsgeschwindigkeit von Einfluß sind. Hemmungsstoffe dürften mit nicht größerem Recht herangezogen werden als ihr Gegenstück, die positiven Aktivatoren, und wo immer möglich, müßte nach der Ursache von Aktivierung oder Paralyse geforscht werden. Namentlich dort, wo es sich um die besonders wichtige Beeinflussung des sekundären Gerinnungsvorgangs, um dessen Auslösung und Hemmung handelt, dürfte dies in vielen Fällen auf Grund der Ergebnisse der kolloidchemischen Forschung gelingen. Aber auch Änderungen am Fermente selbst könnten in Frage kommen. Bei dem soeben erwähnten Versuch von van Dam muß bei der Ammonsulfatfällung, und in gleicher Weise bei der Fällung mittels Magnesiumkarbonat oder eines sich bildenden Eiweißniederschlags nach Hammarsten

¹⁾ van Dam, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64 (1910) 316.

²⁾ Pekelharing, Archive des Sciences biol. Petersburg 11 (1905) 36, Suppl. (Festschrift für Pawlow).

(loc. cit.) Pepsin aus der Lösung eliminiert werden. Hierdurch, wie auch bei einem Pepsinverlust auf irgendwelcher anderen Grundlage¹⁾, sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit des proteolytischen Hauptprozesses, das gebildete Parakasein wird infolgedessen langsamer weiter verändert und kann sich dementsprechend bis zur Konzentration, die für die Gerinnung notwendig ist, in der Lösung ansammeln. Die Geschwindigkeit der Proteolyse hängt aber nicht allein vom Fermentgehalt ab, sondern von der Gegenwart der aktivierenden Wasserstoffionen. Die Dialyse, welche deren Konzentration vermindert, wird daher ebenfalls die Verdauungsgeschwindigkeit herabsetzen und kann damit die Parakaseinkoagulation begünstigen.

Was durch Verlangsamung der Proteolyse erreicht wird, wird ebensogut durch Beschleunigung der Auslösung des Nebenprozesses, der Kaseingerinnung, erzielt. Je früher diese Auslösung stattfindet, desto mehr wird die Labwirkung das Bild beherrschen, und umgekehrt, vorausgesetzt, daß die Bedingungen für die Umwandlung des Kaseins in Parakasein gegeben sind.

Die kolloidchemische Beeinflussung des Gerinnungsprozesses durch Kationen und Anionen. Von Wasserstoffionen, wie auch von Hydroxylionen, schon den freien Hydroxylionen der Milch²⁾, wird nicht nur der Hauptprozeß beeinflusst, sondern vor allem auch die Auslösung des Nebenprozesses, die Gerinnung also, so daß es sich in der schließlichen Beeinflussung der Labung durch diese Faktoren sowohl um einen Summations- wie um einen Differenzeffekt handeln kann.

Kolloidchemisch würden die Beobachtungen bei der Milchgerinnung am einfachsten unter der Annahme zu deuten sein, daß Parakasein als negativ geladenes Kolloid durch die entgegengesetzt geladenen Wasserstoffionen und mehrwertigen Salzkationen ausgefällt, durch die gleichgeladenen Hydroxylionen, und namentlich die mehrwertigen Salzanionen in Lösung gehalten wird. Das Optimum für den Gerinnungsprozeß liegt nach van Dam³⁾ und Allemann⁴⁾ bei der H⁺-Ionenkonzentration von $1,3 \cdot 10^{-5}$. Bei höheren Wasserstoffionenkonzentrationen könnte die Umladung des Kolloids und damit der Umschlag zum gegenteiligen Effekt einsetzen, wodurch die tiefergehende Spaltung (Pepsinwirkung) indirekt begünstigt würde.

¹⁾ Siehe z. B. den früher erwähnten Versuch von Burge.

²⁾ van Dam, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64 (1910) 316; siehe ferner im folgenden.

³⁾ van Dam, Zeitschr. f. physiol. Chem. 58 (1908) 295.

⁴⁾ Allemann, Biochem. Zeitschr. 45 (1912) 346.

Hydroxylionen wirken sowohl auf die Parakaseinbildung wie auf die Gerinnung sehr stark hemmend. Laqueur ¹⁾ fand für den ersten, also den fermentativen Prozeß, den er an Hand der Viskositätszunahme verfolgte, schon vor dem Farbumschlag des Phenolphthaleins, der ungefähr bei der Wasserstoffionenkonzentration von 10^{-9} erfolgt, beträchtliche Schädigung, und Schmidt-Nielsen ²⁾ sowie Moseley und Chapman ³⁾ zeigten für den Gesamtprozeß dasselbe bei den zwischen Lackmus- und Phenolphthaleinneutralität liegenden Hydroxylionenkonzentrationen. Daß Menschenmilch schlechter gerinnt als andere ⁴⁾ und beim Versetzen mit fremder Milch sogar deren Gerinnung hemmt, ist eine Folge ihres höheren Hydroxylionengehaltes; denn wie Raudnitz ⁵⁾, Szydowski ⁶⁾, L. F. Meyer ⁷⁾ und Engel ⁸⁾ zeigten, läßt sich der Menschenmilch durch Zusatz von wenig Säure oder von positivierendem Chlorkalzium ⁹⁾ normale Gerinnungsfähigkeit erteilen. Dieselbe Wirkung übt ein Säurezusatz oder die natürliche Säurebildung nach Bakterieninfektion auch auf sterile Milch aus, in der die Hydroxylionen die Gerinnung völlig zu verhindern vermögen ¹⁰⁾. Auf der Zunahme der Hydroxylionen beim Erwärmen der Milch auf 38° beruht ferner nach van Dam ¹¹⁾ die Verminderung oder völlige Vernichtung der Labgerinnung, während die Verdauung gemessen nach Mett erhalten ist.

Was die viel schlechtere Labungsfähigkeit der gekochten und die überhaupt fehlende der sterilisierten Milch ¹²⁾ betrifft, so scheint der Verfasserin, daß zur Erklärung dieses Unvermögens mindestens zum Teil die zunehmende Schwerverdaulichkeit des Kaseins beim Erhitzen

¹⁾ Laqueur, Ueber das Kasein als Säure und seine Unterscheidung gegen das durch Lab veränderte Parakasein. Theorie der Labgerinnung, Inaug.-Dissert., Breslau 1905; Hofmeisters Beitr. 7 (1905) 273.

²⁾ Schmidt-Nielsen, Upsala Läkarefören Förh. [N. F.] 11, Suppl. (1906) 26 (Festschrift für Hammarsten); Biochem. Zentralbl. 5, 1895.

³⁾ Moseley u. Chapman, Proc. Linnean Soc. New South Wales 31 (1906) 568; Biochem. Zentralbl. 7, 73.

⁴⁾ Courant, Archiv f. d. ges. Physiol. 50 (1891) 109.

⁵⁾ Raudnitz, Prager med. Wochenschr. (1887) 198.

⁶⁾ Szydowski, Prager med. Wochenschr. (1892) 365; Jahrb. f. Kinderheilkunde 34, 411.

⁷⁾ L. F. Meyer, Berliner klin. Wochenschr. (1906) 1439.

⁸⁾ Engel, Biochem. Zeitschr. 13 (1908) 88.

⁹⁾ Fuld u. Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 5 (1907) 118, 8 (1908) 376.

¹⁰⁾ Kreidl u. Lenk, Biochem. Zeitschr. 36 (1911) 357.

¹¹⁾ van Dam, loc. cit. Fußnote 3, vorige Seite.

¹²⁾ Loevenhart, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41 (1904) 177; Smeliansky, Archiv f. Hygiene 59 (1906) 187.

herangezogen werden könnte, da Hempel¹⁾ gezeigt hat, daß nach einmaligem kurzen Aufkochen der Milch 18 %, nach zweimaligem kurzen Aufkochen sogar 30 % unverdaulicher Rückstand bei der Behandlung mit Pepsin, Salzsäure und Pankreatin zurückbleiben, während rohe Milch einen unverdaulichen Rückstand von nur 11 % des gesamten Milcheiweißes²⁾ hinterläßt. Die Kaseinverdauung würde in hitzeveränderter Milch erst bei saurer Reaktion, der gewöhnlichen Pepsinverdauung entsprechend, vor sich gehen. Nichtsdestoweniger muß man sich auch bei Annahme eines Zusammenhangs zwischen Schwerverdaulichkeit des Kaseins und Ausbleiben der Labung fragen, was Ursache und was Wirkung ist. Die Sache kann ja so liegen, daß das Kasein gerade wegen des Ausbleibens der Labung schwer verdaulich ist³⁾, und wenn nicht auf physikalische Zustandsänderungen⁴⁾ zurückgegriffen wird, wäre es wiederum am wahrscheinlichsten, einen bleibenden Mehrgehalt an Hydroxylionen in einmal erhitzt gewesener Milch⁵⁾ für die Hemmung der Labung verantwortlich zu machen. Läßt sich ein solcher Mehrgehalt nach dem Erkalten der Milch nicht nachweisen, so bliebe immer noch die Möglichkeit, daß die während des Erhitzens freiwerdenden Hydroxylionen von den Eiweißkörpern der Milch locker gebunden worden sind und in dieser Form wie freie Hydroxylionen als lösungsbegünstigendes Agens gegenüber dem Parakasein zu fungieren vermögen. Jedenfalls spricht für eine Beteiligung der Hydroxylionen an der Gerinnungshemmung, daß das Chlorkalzium

¹⁾ Hempel, Vortrag, gehalten an der 79. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte zu Dresden (1907). Verhandl. d. Ges. deutscher Naturforscher und Aerzte, 1. Teil. (Leipzig 1908) S. 118.

²⁾ Die Gesamtmenge des Milcheiweißes beträgt 3,67 %.

³⁾ Siehe Tobler, loc. cit., Abderhalden u. Kramm, loc. cit., sowie Sahli, loc. cit. dieser Abschnitt. Fußnoten 4, 5 u. 6 Seite 259.

⁴⁾ Vielleicht sind physikalische Zustandsänderungen des Kaseins oder Parakaseins für die Begünstigung der Gerinnung durch Gefrieren verantwortlich zu machen; doch könnte man, außer an einen Entzug des Lösungsmittels (Wasser), an eine mechanische Wirkung des intramolekularen Wassers, bzw. des Imbibitionswassers von Molekülaggregaten des Kaseins denken, geradeso wie bei der Wirkung des Gefrierens auf die Stärke. Die bei einem solchen „Verwitterungsprozeß“ auseinandergesprengten Teile von Molekülaggregaten repräsentieren eine größere Oberfläche für den Angriff des proteolytischen Ferments, und auch die Labung setzt dementsprechend rascher ein. Nach Bienenfeld, Biochem. Zeitschr. 7 (1908) 262, würde allerdings überhaupt keine echte Labung, sondern lediglich eine Säurefällung der gefrorenen Milch vorliegen.

⁵⁾ Die Hemmung durch erhitztes Kaninchenserum, welche P. Th. Müller, Zentralbl. f. Bakteriologie 32 (1902) 521, aufgefunden hat, dürfte auf ähnlicher Grundlage beruhen.

auch der gekochten Milch die Gerinnungsfähigkeit wiedergibt, sei es infolge seiner zweiwertigen, die Fällung anodischer Kolloide begünstigenden positiven Kalziumionen, sei es infolge des positivierenden Einflusses, der sich überhaupt bei der Einwirkung von Chlorkalzium auf Eiweiß geltend macht¹⁾, und wie dies van Dam²⁾ im besonderen für den vorliegenden Fall annimmt, auf dem Freimachen von Wasserstoffionen beruht, denen die Gerinnungsgeschwindigkeit nach van Dam³⁾ und Allemann (loc. cit.) proportional ist. Infolge dieser Abhängigkeit der Gerinnung vom Wasserstoffionengehalt wirken die stark dissoziierten Mineralsäuren bei geringerer Konzentration⁴⁾ als die schwachen Säuren, mit der einen Ausnahme der Borsäure⁵⁾, bei welcher der zu der Wasserstoffionenkonzentration in keinem Verhältnis stehende starke Effekt auf der Teilnahme der undissoziierten Moleküle beruhen dürfte. Ob dabei eine mit der Fermentschädigung zusammenhängende Beziehung zur antiseptischen Wirkung der Borsäure besteht, derzufolge der fermentative Hauptprozeß direkt und durch seine Verlangsamung der sekundäre Gerinnungsvorgang in der früher angegebenen Weise beeinflußt würde, bleibe dahingestellt. Die ähnliche Diskrepanz zwischen antiseptischer Wirkung und Wasserstoffionenkonzentration bei der Wirkung der Borsäure auf die lebende Zelle ließe an eine derartige Beziehung denken.

(Von sonstigen Antiseptika hat Freudenreich⁶⁾ Thymol, Formaldehyddampf und Bichromat von stark hemmendem Einfluß auf die Labwirkung gefunden, während 0,5—1 %ige Formalinlösungen, sowie Chloroform⁷⁾ fast einflußlos waren. Für Wasserstoffperoxyd und die Halogene fand Gerber⁸⁾ ebenfalls wechselnde Resultate, je nach der Natur des untersuchten Labs, welches von der fermentschädigenden Wirkung der Antiseptika betroffen wird.)

Von mindestens ebenso großer Bedeutung wie Säuren und Basen sind für die Milchgerinnung die Salze, und zwar stehen hier die schon erwähnten löslichen Kalziumsalze so sehr im Vordergrund der Dis-

¹⁾ Siehe Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe.

²⁾ van Dam, Zeitschr. f. physiol. Chem. 58 (1908) 295.

³⁾ van Dam, loc. cit. vorige Fußnote.

⁴⁾ Pfeleiderer, Archiv f. d. ges. Physiol. 66 (1897) 605.

⁵⁾ Gerber, Soc. Biol. 64 (1908) 1176, 1178; Agulhon, Ann. Inst. Pasteur 24 (1910) 495.

⁶⁾ Freudenreich, Zentralbl. f. Bakteriologie. [2] 4 (1898) 309.

⁷⁾ Siehe demgegenüber jedoch Benjamin, Virchows Archiv 145 (1896) 30, der Chloroform hemmend fand.

⁸⁾ Gerber, Soc. Biol. 72 (1912) 881, 946, 1002, 1112, 73 (1912) 354.

kussion, daß man sich fragen könnte, ob es sich um einen spezifischen gerinnungsbeschleunigenden Einfluß der Kalziumionen handelt. Eine solche Spezifität liegt jedoch keineswegs vor.

Nach Lundberg ¹⁾, Arthus ²⁾, Wróblewski ³⁾, Lörcher ⁴⁾, Loevenhart ⁵⁾, Smeliansky ⁶⁾ und Gerber ⁷⁾ wirken die Salze des Ba, Sr, Mg, Al, Be, Li, sowie die Salze des zweiwertigen Fe, Ni, Co und Mn den Kalziumsalzen analog, während die Schwermetallsalze mit meist mehrwertigem Metall von geringer elektrolytischer Lösungstension, insbesondere die Salze des Hg, Cu, Au und der Platinmetallgruppe die Gerinnung des Parakaseins bei der Labung hemmen oder, was wahrscheinlicher ist, fermentzerstörend wirken, wodurch die Parakaseinbildung unterbleibt. Bei höherer Temperatur reichen geringere Salzmenngen zur Fällung hin als bei niedriger. Agenzien, welche die erwähnten Salze eliminieren (Oxalate, Rhodanate) ⁸⁾, Phosphate für Kalzium, Schwefelsäure für Barium usw. wirken unabhängig von der vorhandenen Fermentmenge gerinnungshemmend, wie dies Korschun ⁹⁾ und Gerber ¹⁰⁾ gezeigt haben. Kalziumsalze vermögen nach Spiro ¹¹⁾ aus leicht begreiflichen Gründen als natürliches Gegengift gegenüber den Kalziumfällungsmitteln zu fungieren. Doch ist der Zusammenhang zwischen Gerinnbarkeit und Kalziumgehalt noch nicht ganz abgeklärt. Am einfachsten ist die hier vertretene Annahme eines kolloiden Fällungsvorgangs durch die mehrwertigen Kationen gegenüber anodischem Parakasein, wofür auch die Gegenwirkung gegenüber dem hemmenden Einfluß des reinen Kochsalzes und der mehrwertigen Anionen (Sulfat, Zitrat) ¹²⁾ usw. spricht, eine Gegenwirkung, die überall in der Natur zutage tritt ¹³⁾. Die Ungerinnbarkeit der Oxalatmilch hat vielleicht nicht nur in der Fällung der löslichen Kalksalze ihre Ursache, sondern auch in der Zweiwertigkeit des Oxalatanions, und es würde sich aus der kolloidchemischen Wechselwirkung zwischen dem anodischen Parakasein und dem gleichgeladenen Oxalatanion die merkwürdige Beobachtung von van Dam ¹⁴⁾ erklären, daß trotz eines zur vollständigen Fällung der löslichen Kalziumsalze ausreichenden Zusatzes von Oxalat doch nur 25 % des Kalziums ausgefällt werden. Das wäre noch

¹⁾ Lundberg, *Malys Jubil.* (1876) 11.

²⁾ Arthus, *Archive Physiol.* [5] 2 (1890) 330, 540.

³⁾ Wróblewski, *Ber. d. chem. Ges.* 28 (1895) 1719.

⁴⁾ Lörcher, *Pflügers Archiv* 69 (1898) 188.

⁵⁾ Loevenhart, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 41 (1904) 177.

⁶⁾ Smeliansky, *Archiv f. Hygiene* 59 (1906) 187.

⁷⁾ Gerber, *Compt. rend.* 150 (1910) 1202, 1357, *Soc. Biol.* 63, 741, 64, 66, 374, 783, 68, 384, 631, 634, 636, 935, 69 (1910) 102, 211; siehe auch weitere Arbeiten dieses Forschers in den *Compt. rend. Soc. Biol.* von 1906 an.

⁸⁾ Vielleicht beruht die labhemmende Wirkung des Speichels, welche Al-laria, *Riv. Clin. Pediatr.* (1911) 1; *Biochem. Zentralbl.* 13, 1842, dem Muzin zuschreibt, auf dem Rhodanatgehalt.

⁹⁾ Korschun, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 36 (1902) 141.

¹⁰⁾ Gerber, loc. cit. Diese Seite, Fußnote 7 u. vorige Seite, Fußnote 5 u. 8.

¹¹⁾ Spiro, loc. cit.

¹²⁾ van Dam, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 58 (1908) 295.

¹³⁾ Siehe Höber, *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe.*

¹⁴⁾ van Dam, loc. cit. vorletzte Fußnote.

kein Grund gegen eine Beteiligung der Kalziumionen am Gerinnungsprozeß, wie van Dam (loc. cit.) angenommen hat, und wenn er weiter findet, daß es gerade das an Kasein bzw. Parakasein sich bindende Kalzium ist, welches die Gerinnung beschleunigt, so bedeutet auch dies keinen Widerspruch zu der Annahme einer Beteiligung der Kalziumionen am Gerinnungsvorgang, sondern im Gegenteil nur die kolloidchemische Umschreibung dieses Prozesses, da die Wechselwirkung zwischen dem negativen Kolloid und den positiven Kalziumionen ja gerade das Eingehen von Kalzium in das Koagulum, das hierdurch zum indifferenten isoelektrischen Gerinnsel wird, zur Voraussetzung hat.

Wirkt das gerinnungsbeschleunigende Chlorkalzium indirekt, wie van Dam (loc. cit.) annimmt durch in Freiheitsetzen von Wasserstoffionen, so ist auch dabei noch die kolloidchemische Betrachtungsweise gewahrt aus den bei der Säurewirkung angeführten Gründen. Bei der Frage nach der Herkunft der freiwerdenden Wasserstoffionen wäre an die sauren Phosphate zu denken. Vielleicht kommt auch deren Ueberführung in normales Kalziumphosphat [das nach Bang¹⁾ von ausschlaggebender Bedeutung für die Gerinnung ist] als gerinnungsbeschleunigendes Moment in Betracht; denn im dissoziierten Anteil wird die gerinnungshemmende Wirkung des Phosphatanions durch die Gegenwirkung des positiven Kalziumions kompensiert, und im undissoziierten Anteil käme sie natürlich überhaupt nicht in Frage. Die Ueberführung von hemmenden Phosphatanionen in eine indifferente Verbindung wäre also gleichbedeutend mit der Ausschaltung eines Hemmungsfaktors der Gerinnung.

Somit besteht kein zwingender Grund, die Erscheinungen, die bei der Labgerinnung in Gegenwart von Säuren, Basen und Salzen beobachtet worden sind, anders als aus der kolloidchemischen Wechselwirkung von negativen Kolloiden mit Kationen und Anionen der Elektrolyte zu erklären, und nach den für diese Wechselwirkung bestehenden Gesetzen (die nur da und dort, wie bei der Schwermetallsalzwirkung durch die Schädigung des vorausgegangenen fermentativen Prozesses komplizierteren Charakter anzunehmen scheinen). Dies ist auch der Fall für die Beeinflussung der Gerinnung durch andere Kolloide. Sind dieselben gleichsinnig geladen wie das Parakasein, so halten sie es in Lösung. Sie wirken als Schutzkolloide, wie ganz allgemein diese kolloidchemische Beziehung die Eigenschaft als Schutzkolloid zu wirken, bedingen dürfte. Als solche Schutzkolloide gegenüber dem Parakasein fungieren z. B. nach Gerber und Berg²⁾ die übrigen Eiweißkörper der Milch und verwandte Stoffe³⁾.

¹⁾ Bang, Skand. Archiv Physiol. 25 (1911) 105; Ergebn. f. inn. Medizin 9 (1912) 435. Siehe auch über die Konstitution von Kasein und Parakasein und deren Beziehung zum Kalziumphosphat die widersprechenden Angaben von Eugling, Landwirtsch. Versuchsstat 31 (1885) 391; Söldner, Ebenda 35 (1888) 351; Courant, Reaktion der Kuh- und Frauenmilch, Dissert., Breslau 1891; Pfügers Archiv 50 (1891) 109; Fuld, Ergebn. d. Physiol. 1 (1902) 1468; Preti, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53 (1907) 419; Kikkaji, Ebenda 61 (1909) 139; Wernken, Zeitschr. f. Biol. 52 (1909) 47. Die Differenzen zwischen den beiden Eiweißkörpern beziehen sich nicht nur auf das physikalische, sondern auch auf das chemische Verhalten.

²⁾ Gerber u. Berg, Soc. Biol. 64, 143, 65 (1903) 180.

³⁾ Siehe ferner die Annahme von Reichel und Spiro, daß es sich um einen noch komplizierteren Prozeß handle. Hofmeisters Beitr. 7 (1905) 479, 8 (1906) 15.

Der Umstand, daß sich ein labender Einfluß schon im neutralen Medium geltend macht, während die Pepsinspaltung sensu stricto an die Gegenwart von Wasserstoffionen geknüpft ist, spricht wie die bisher erwähnten Tatsachen ebenfalls nicht gegen den unitarischen Gedanken, auch nicht in seiner absolutesten Form; denn man kann, ohne mit Theorie und Praxis in Konflikt zu geraten, annehmen, daß nicht die erste — die als Labwirkung zutage tretende — Phase, sondern nur der Spätverlauf der Pepsinspaltung an die saure Reaktion gebunden ist.

In etwas anderer Weise hat dies Michaelis¹⁾ zum Ausdruck gebracht, welcher die Labwirkung dem in neutraler Lösung zur Anode wandernden Ferment zuschreibt, während die proteolytische Wirkung desselben Fermentes mit der Umkehrung des Wanderungssinns in saurer Lösung zusammenhängen würde.

Für das Vorhandensein einer solchen mehr oder weniger gegen die folgenden abgegrenzten ersten Spaltungsphase spricht auch der mit Unrecht²⁾ zugunsten des dualistischen Standpunkts herangezogene Unterschied des Pepsin- und des Labgesetzes³⁾.

Resümieren wir, so können wir das zur Stunde vorliegende Tatsachenmaterial in der erörterten Frage nicht als beweisend für das Vorhandensein zweier unabhängiger Enzyme mit zwei voneinander zu trennenden Wirkungen — der Lab- und der Pepsinwirkung — ansehen. Ja es ist sogar überflüssig, die zwischen dualistischer und absolut unitarischer Auffassungsweise die Mitte haltende Ansicht von Nencki und Sieber⁴⁾ anzunehmen, auf deren Boden noch Pawlow stand, wonach beide Wirkungen am selben Enzymmolekül, aber an verschiedenen Seitenketten haften; denn ist die Labwirkung nur eine erste Phase der Proteolyse, so ist nicht einzusehen, warum für den prinzipiell gleichen Vorgang der Spaltung zwei verschiedene Gruppen verantwortlich gemacht werden müßten⁵⁾. Die durch ungleichartiges

¹⁾ Michaelis, Biochem. Zeitschr. 17 (1909) 231.

²⁾ Reichel, Wien. klin. Wochenschr. 21 (1908) 1085; siehe auch Oppenheimer, Die Fermente, Bd. 2, Leipzig 1913, S. 559, 561, 562.

³⁾ Nach Köttlitz (siehe im folgenden) würde nicht einmal ein solcher Unterschied bestehen.

⁴⁾ Nencki u. Sieber, Zeitschr. f. physiol. Chem. 33 (1901) 291; Arch. des sciences biol. Petersburg 9 (1902) 47; siehe auch Pekelharing, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22 (1896/97) 233.

⁵⁾ Immerhin ist an die schon erwähnte Möglichkeit zu denken, daß die erste Phase der Eiweißspaltung ähnlich wie dies für die erste Phase der diastatischen Stärkespaltung jüngst durch Karrer erwiesen worden ist, ein Depolymerisationsvorgang wäre, während die bis zu Peptonen führende Wirkung des Pepsins demgegenüber schon an hydrolytische Prozesse gebunden sein könnte.

Substrat verursachten Modifikationen des Pepsins reichen hin, um die mannigfachen Abstufungen im Verhalten gegenüber Kasein und anderem Nahrungseiweiß zu erklären.

Mit der Annahme solcher Modifikationen verläßt man allerdings streng genommen den unitarischen Boden, aber doch in ganz anderer Weise, als es dem dualistischen Gedanken entspricht, und vor allem man geht in dieser Richtung nicht weiter als bei irgend einem anderen Ferment, wo man ebenfalls die mannigfachsten Anpassungen an das Substrat beobachten kann.

Die Labwirkung pflanzlicher Proteasen. Was wir für die Zusammengehörigkeit des Labs und der proteolytischen Enzyme des Verdauungstraktus vorgebracht haben, kann Punkt für Punkt auch für die zahlreichen anderen Enzyme mit labender Wirkung, die sich im Magen- und Pankreassaft, im Dünndarm ¹⁾, in den verschiedensten Organextrakten der Tiere ²⁾ und im Pflanzenreiche ³⁾ finden, wiederholt werden. Gerade das Vorkommen bei den Pflanzen, von welchen außer ihrer schon erwähnten Verwendung in der antiken Käserei das echte Labkraut (*Galium verum*)⁴⁾, in Deutschland, die Blüten und Samen ⁵⁾ der Artischocken, sowie der Saft des Feigenbaums auf Mallorca ⁶⁾, die *Withania coagulans* ⁷⁾ bei den Hindus und die *Pinguicula vulgaris* (Linné, Pfeffer) in Lappland und den italienischen Alpen noch immer vereinzelte Verwendung finden, illustriert schlagend, daß die labende Tätigkeit eines Fer-

¹⁾ Baginsky, Zeitschr. f. physiol. Chem. 7 (1882) 209. Das von Pfeiffer, Zeitschr. f. experim. Pathol. 3 (1906), in den Fäzes aufgefundene Lab soll ebenfalls aus dem Darm stammen (vgl. die Angaben über Kaseinspaltung durch Erepsin).

²⁾ Ueber das Vorkommen von Labwirkung bei den Proteasen der niedrigen Tiere (z. B. Ascidien, Krustazeen, Würmer, Kephelopoden) siehe Sellier, Soc. Biol. 61 (1906) 449, 62 (1907) 693, 63 (1907) 705; Gerber u Daumézou, Ebenda 66 (1909) 193.

³⁾ Siehe über das Vorkommen des Chymosins außer der im folgenden angegebenen Literatur Czapek, Biochemie der Pflanzen 2 (1905) 49; Oppenheimer, Fermente, Bd. 2, Leipzig 1913, S. 572, 573, 619—623; Fuhrmann, Bakterienenzyme, Jena 1907, S. 66.

⁴⁾ Green, Ann. Bot. 7 (1893) 112; siehe ferner Derselbe, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 48 (1890) 391.

⁵⁾ Ueber die weite Verbreitung von Proteasen in keimenden und Proteasezymogenen in ungekeimten Samen siehe Oppenheimer, Die Fermente 2 (1913) 607—610.

⁶⁾ Siehe Herdi, loc. cit. S. 254, Fußnote 6.

⁷⁾ Lea, Proc. Royal Soc. London 36 (1883) 55.

menten nur Begleiterscheinung, niemals aber Hauptfunktion sein kann; denn das Auftreten von Fermenten in der Natur richtet sich ganz nach den vorhandenen Bedürfnissen des Fermentträgers. Daß aber eine Pflanze das ganz absonderliche Bedürfnis empfinden sollte, Milch zu koagulieren, und nach Gerber¹⁾ und Briot²⁾ (wohl im Zusammenhang mit den ungleichen Fällungsbedingungen der Phytochymasen gegenüber Salzen, insbesondere Kalksalzen)³⁾ häufig sogar gekochte Milch besser als rohe, darf wohl kaum vorausgesetzt werden. Für das Zusammengehen von starker proteolytischer und Labwirkung fehlt es außerdem auch im Pflanzenreiche nicht an markanten Beispielen. Der labende Einfluß folgt dem Papayotin⁴⁾ von *Carica papaya*⁵⁾, dem gleichfalls Eiweiß spaltenden Bromelin⁶⁾ der Ananas, den Proteasen⁷⁾ der fleischfressenden Pflanzen⁸⁾, dem Papayotin-ähnlichen Ferment des

¹⁾ Gerber, loc. cit. und Compt. rend. **145**, 284, **146**, 1111.

²⁾ Briot, Journ. Physiol. Pathol. gén. **9** (1907) 636.

³⁾ Gerber, Soc. Biol. **62** (1907) 1223 und loc. cit. vorletzte Fußnote.

⁴⁾ Ueber die proteolytische Wirkung des Papayotins siehe Griffith Hughes, Natural history of Barbadoes **7** (1750) 181; Browne, Civil and natural hist. of Jamaica (1756) 160; Wittmack, Sitzungsber. d. Gesellsch. naturforschender Freunde, Berlin 1878, S. 40; Versamml. deutscher Naturforscher u. Aerzte, 1879, S. 222; Peckolt, Pharm. Journ. [3] **10** (1879) 343; Wurtz u. Bouchut, Compt. rend. **89** (1879) 425; Wurtz, Ebenda **90** (1880) 1379, **91** (1880) 787; Moncorvo, Journ. Therap. **7** (1880) 547, 729, 734; Albrecht, Korrespondenzbl. f. Schweizer Aerzte **10** (1880) 680, 712; Roßbach, Zeitschr. f. klin. Medizin **6** (1883) 527; Harlay, Journ. Pharm. Chim. [6] **11**, 268; Martin, Journ. Physiol. **5** (1884) 313, **6**, 336; Weeg, Ueber Papain, Dissert., Bonn 1885; Hirschler, Ungar. Archiv f. Medizin **1**, 341; Malys Jahrb. (1892) 19; Sittmann, Münchener med. Wochenschr. (1893) 548; Hirsch, Therap. Monatsh. (1894) 609; Chittenden, Mendel u. Dermott, Journ. Physiol. **1** (1898) 255; Takemura, Zeitschrift f. physiol. Chem. **63** (1909) 201; v. Stenitzer, Biochem. Zeitschr. **9** (1908) 382; Pozerski, Ann. Inst. Pasteur **23** (1909) 205, 321 und die im folgenden angegebene Literatur.

⁵⁾ Parmentier u. Deycax, Crells Ann. **1** (1793) 449.

⁶⁾ Chittenden, Journ. Physiol. **15** (1894) 249; Caldwell, Bot. Gaz. **39** (1905) 409.

⁷⁾ Hooker, Nature **10** (1874) 366; Rees u. Will, Bot. Zeitschr., 29. Oktober 1875; Sitzungsber. d. Erlanger Phys. med. Soc. **8** (1875) 13; Canby, Oesterr. bot. Zeitschr. **25** (1875) 287; Cohn, Beitr. Biol. Pflanzen **1** (1875) 3, 71; v. Gorup-Besanez, Ber. d. chem. Ges. **9** (1876) 673; Vines, Journ. Anat. and Physiol. **11** (1877) 124; Hansen, Arbeiten aus dem bot. Inst. Würzburg **3**, 265; Pfeffer, Landwirtsch. Jahrbücher **6** (1877) 969; Abderhalden u. Ternuchi, Zeitschr. f. physiol. Chem. **49** (1906) 20; Morren, Bull. Acad. Scienc. de Belgique [2] **39**, 870, **40**, 6, 525, 1040, **42**, 1019; White, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] **83** (1910) 134; v. Luetzelburg, Flora **100** (1910) 145.

⁸⁾ Darwin, Insectivorous Plants, 2. Aufl., 1875, S. 114.

Feigenbaumsaftes¹⁾ und anderen Proteasen²⁾ der Phanerogamen und Kryptogamen.

Unter den Phanerogamen fand Javillier³⁾ am häufigsten Lab bei den Euphorbiazeen, den Kruziferen, Liliazeen, Kompositen und Umbelliferen, und zwar erwiesen sich namentlich die Blätter als labführend. In Oleazeen und Polygoneazeen wurde demgegenüber kein Lab gefunden.

Auch bei den Kryptogamen scheint Labwirkung weit verbreitet zu sein. Bei Myxomyzeten (*Fuligo varians*) fand sie Schroeder⁴⁾, entsprechend der zuerst von Krukenberg⁵⁾, in diesen Organismen aufgefundenen Protease. Denselben Zusammenhang fanden Bodin u. Lenormand⁶⁾, bei dem parasitischen *Streptothrix Mikrosporon* (Oosporaform), wo das zunächst gebildete Kasein- resp. Parakaseinkoagulum geradeso der weiteren Proteolyse verfällt wie andere Eiweißstoffe, z. B. Gelatine. Ferner wurde von Saito⁷⁾ Labwirkung und Proteolyse bei Schimmelpilzen (*Aspergillus oryzae*) festgestellt⁸⁾.

Für Hefe ist sowohl Labwirkung von Boullanger⁹⁾ und Rapp¹⁰⁾, wie proteolytische Wirkung gegenüber Kasein, Eieralbumin, Fibrin, Hefeeiweiß und Gelatine meist an Hefepreßsäften festgestellt worden (Endotryptase der Hefe¹¹⁾).

¹⁾ Wittmack, loc. cit. Fußnote 4, vorige Seite; Hansen, loc. cit. Fußnote 7, vorige Seite; Bouchut, Compt. rend. 91 (1880) 67.

²⁾ Gerber u. Flourens, La présure du latex de *Calotropis procera*, Compt. rend. 155 (1912) 408; siehe ferner Green, Ann. Bot. 6 (1892) 195 (Protease in den Früchten von *Cucumis utillissimus*); Pantanelli, Zentralbl. f. Bakteriologie. [2] 31 (1912) 545 (Traubenprotease); Bufalini, Arch. Farmacol. 8 (1910) 433; Biochem. Zentralbl. 10, 1986 (negativer Befund über *Anagallisprotease*).

³⁾ Javillier, Contribution à l'état de la présure chez les végétaux, Thèse Paris 1903.

⁴⁾ Schroeder, Hofmeisters Beitr. 9 (1907) 153

⁵⁾ Krukenberg, Untersuch. a. d. physiol. Institut Heidelberg 2, 273.

⁶⁾ Bodin u. Lenormand, Ann. Inst. Pasteur 15 (1901) 279.

⁷⁾ Saito, The Bot. Mag. Tokyo 17, 201; Biochem. Zentralbl. 2 (1904) 1870, 1871.

⁸⁾ Ueber die proteolytische Wirkung der Takadiastase siehe auch Olga Szanto, Biochem. Zeitschr. 43 (1912) 31. Siehe ferner über Proteasen bei Schimmelpilzen: Fermi u. Buscaglioni, Zentralbl. f. Bakteriologie. [2] 5 (1899) 125; Bourquelot u. Hérissé, Bull. Soc. Mycol. France 15 (1899); Compt. rend. 127, 66; Malfitano, Ann. Inst. Pasteur 14 (1900) 60; Schäffer, Fermente in Schimmelpilzen, Dissert., Erlangen 1900.

⁹⁾ Boullanger, Ann. Inst. Pasteur 10 (1896) 598.

¹⁰⁾ Rapp, Zentralbl. f. Bakteriologie. [2] 9 (1902) 625.

¹¹⁾ Siehe die Arbeiten von Thénard, Ann. Chim. 46, 294; Duclaux, Thèse Paris 1885, S. 44; Pasteur, Ann. Chim. Phys. 58, 401; Schützenberger, Internat. wissenschaft. Bibl. (1875); Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13 (1889) 506; Zeitschr. f. klin. Medizin 17, Suppl.; Hahn u. Geret, Ber. d. chem. Ges. 31 (1898) 2335; Zeitschr. f. Biol. 40 (1900) 117; Will, Zentralbl. f. Bakteriologie. [2] 7 (1901) 794; Schütz, Hofmeisters Beitr. 3 (1903) 433; Gromow u. Grigorjew, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42 (1904) 299; Schenk, Zeitschr. f. Spiritusind. 28, Nr. 42—44; Effront, Bull. Soc. Chim. 33 (1905) 847; Buchner

Ferner wurden für die höheren Pilze einerseits proteolytische Wirkungen¹⁾, anderseits Kaseingerinnungsfähigkeit nachgewiesen²⁾. Gerber³⁾ fand Labwirkung auch bei Algen (Phäophyzeen).

Daß auch bei Bakterien Zusammenhänge zwischen dem die proteolytische und dem die labende Wirkung vermittelnden Agens bestehen, trotz der gegen- teiligen Angaben von van der Leek⁴⁾, zeigt die auffallende Koktostabilität des die proteolytische Wirkung derselben Bakterien (z. B. *Bac. prodigiosus*) und deren Labwirkung vermittelnden Trägers⁵⁾.

Von besonderer Wichtigkeit und für die Auffassung der Lab- wirkung als Teileffekt der proteolytischen beweisend ist dann vor allem

u. Hahn, Die Zymasegärung, 2. Teil, München 1903, S. 287 ff.; Hahn, Münchener med. Wochenschr. (1903) 2172; Buchner u. Hoffmann, Biochem. Zeitschr. **4** (1907) 217; Buchner u. Klatte, Ebenda **9** (1908) 436; Petruschewski, Zeitschr. f. physiol. Chem. **50** (1907) 250; Navassart, Ebenda **70** (1910) 189, **72** (1910) 151; Koelker, Ebenda **76** (1910) 297; Iwanoff, Zeitschr. f. Gärungs- physiol. **1** (1912) 230.

¹⁾ Siehe Hjort, Zentralbl. f. Physiol. **10** (1896) 192; Mouton, Soc. Biol. **55** (1903) 976; Zellner, Chemie der höheren Pilze, Leipzig 1907; Weir, Flora [N. F.] **3** (1911) 263.

²⁾ Gerber, Soc. Biol. **67**, **612**, **867**, **68** (1910) 201, 203, 205, 382.

³⁾ Derselbe, Ebenda **66** (1909) 1122.

⁴⁾ van der Leek, Zentralbl. f. Bakteriologie. [2] **17** (1906) 16.

⁵⁾ Gorini, Hygienische Rundschau (1893) 381; Mesernitzky, Biochem. Zeitschr. **29** (1910) 104; K. Meyer, Ebenda **32** (1911) 274. Siehe ferner über Lab- wirkung der Bakterien: de Bary, Vorlesungen über Bakterien, Leipzig 1885; siehe daselbst Fitz u. Hueppe, Fokker, Deutsche med. Wochenschr. (1892) 1151; Kalischer, Archiv f. Hygiene **37** (1900) 54; Conn, Zentralbl. f. Bakteriologie. **12**, **223**; Loeb, Ebenda **32** (1902) 471. Ueber mehr oder weniger weitgehende proteo- lytische Aufspaltung durch Bakterien siehe Bitter, Archiv f. Hygiene **5** (1886) 245; Brunton u. Macfadyan, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] **46** (1890) 542; Macfadyan, Journ. Anat. Physiol. **26** (1892) 409; Hankin u. Wesbrook, Ann. Inst. Pasteur **6** (1892) 633; Fermi, Archiv f. Hygiene **10** (1890) **1**, **12** (1891) 240, **14** (1892) **1**; Fermi u. Pamparsi, Malys Jahrb. (1897) 827; Auerbach, Archiv f. Hygiene **21** (1897) 311; Zentralbl. f. Bakteriologie. [2] **4** (1898) 492; Schmailo- witsch, Wratschebnaja Gazetta (1902) 52; Biochem. Zentralbl. **1**, 467; Emmer- ling u. Reiser, Ber. d. chem. Ges. **35** (1902) 700; Krause, Zentralbl. f. Bakteriologie. **31** (1902) 673; Taylor, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36** (1902) 487; Mavrojannis, Zeitschr. f. Hygiene **45** (1903) 108; Malfitano, Soc. Biol. **55** (1903) 841, 843, 845, 1611; Malfitano u. Lazarus, Ebenda **63** (1907) 76; Eijkman, Ber. d. chem. Ges. **35** (1904) **1**; de Waele u. Vandeveld, Zentralbl. f. Bakteriologie. **39** (1905) 333; Rettger, Journ. med. Research **13** (1905) 79; Tiraboschi, Ann. di Igiene sperim. **15** (1906) 3; Biochem. Zentralbl. **5**, 500; Abderhalden u. Emmerling, Zeitschr. f. physiol. Chem. **51** (1907) 394; Zak, Hofmeisters Beitr. **10** (1907) 287; de Waele, Zentralbl. f. Bakteriologie. **50** (1909) 40; Lauber, Ebenda **56** (1910) 542; Lazarus, Ann. Inst. Pasteur **24** (1910) 577; Kendall u. Farmer, Journ. Biol. Chem. **12** (1912) 13; v. Gröer, Biochem. Zeitschr. **38** (1912) 252; über Aktinomycesprotease siehe Macé, Compt. rend. **141**, 147.

das hohe Temperaturoptimum (80—90°), welches Chodat und Rouge¹⁾ bei der besonders stark labenden Sykochymase des Feigenbaumsaftes (siehe im vorigen), sowie Bruschi²⁾ und Gerber³⁾ bei Solanaceen und auch manchen anderen Pflanzen auffinden konnten. Denn Papayotin und verwandte Phytoproteasen (Sykochymase) zeigen ja gerade infolge ihres hohen Temperaturoptimums die merkwürdige Erscheinung, erst beim raschen Erhitzen auf 80—90° ihre eiweißspaltende Wirkung auszuüben⁴⁾.

Die Labwirkung bei der parenteralen Eiweißverdauung (Immunitätsreaktionen). Die labende Nebenwirkung proteolytischer Enzyme ist endlich auch vielleicht geeignet, im Gebiet der Immunitätswissenschaft zu einer Vereinheitlichung zu führen, wie dies die nachstehende Erörterung zeigen möge.

Die Fähigkeit, Eiweiß zu spalten, kommt dem Organismus nicht allein an den normalen verdauenden Stätten zu, sondern auch das direkt in die Blutbahn eingeführte, gefomte oder ungeformte Eiweiß wird abgebaut, wobei sich anfänglich die normalen Proteasen der Gewebe und des Blutes, später unter dem Einfluß des Substrates, durch Anpassung der fermentativen Spaltungsmöglichkeiten an dieses, entstandene proteolytische Enzyme beteiligen. Da diese letzteren spezifisch auf das betreffende Substrat eingestellt sind, so werden sie, wenn sie aufs neue mit demselben in Berührung kommen, in solcher Weise mit dem artfremden Eiweiß reagieren, daß dasselbe der raschen Auflösung verfällt.

Die bei dem Abbau beobachteten Nebenerscheinungen haben nun bedauerlicherweise dazu geführt, nicht einen einzigen als proteolytisches Enzym aufzufassenden Immunkörper zu postulieren, sondern deren mehrere, je nachdem sich die Immunkörperwirkung in einer zur „Bakteriolyse“ führenden „Bakteriolyse“, einer Opsonierung⁵⁾,

¹⁾ Chodat u. Rouge, Zentralbl. f. Bakteriöl. [2] 16 (1906) 1—3.

²⁾ Bruschi, Atti d. Reale Accad. dei Lincei [2] 16 (1907) 360; Biochem. Zentralbl. 8, 2655.

³⁾ Gerber, Soc. Biol. 66 (1909) 894, 67 (1909) 318; Col u. Gerber, Ebenda 67 (1909) 869.

⁴⁾ Délézenne, Mouton u. Pozerski, Soc. Biol. 60 (1906) 68; Jonescu, Biochem. Zeitschr. 2 (1906) 177; F. Sachs, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51 (1907) 488; Mendel u. Blood, Journ. Biol. Chem. 8 (1910) 177; siehe ferner Emmerling, Ber. d. chem. Ges. 35 (1902) 695.

⁵⁾ Die durch den Immunkörper abgetöteten Erreger sind nach der Wrightschen Bezeichnungsweise für den Freßakt der Leukozyten vorbereitet und die Wirkung des Immunkörpers wird nach der Zahl der von einer bestimmten Leukozytenquantität phagozytierten Bakterien abgeschätzt.

einer Komplementbindung¹⁾, der Ueberempfindlichkeit²⁾, der durch Aenderung der Oberflächenspannung des Serumbazillengemisches sich äußernden Meiostragminreaktion oder dem Präzipitations-³⁾ und Agglutinationsphänomen⁴⁾ zu erkennen gibt.

Es ist ein nicht hoch genug anzuschlagendes Verdienst von Much⁵⁾, daß er die erstgenannten Reaktionen alle auf ein und denselben lytischen Immunkörper zurückgeführt hat. Auch für Präzipitation und Agglutination hat er die Vereinheitlichung versucht, hebt aber die Schwierigkeit hervor, die dadurch bedingt ist, daß diese beiden Vorgänge im Gegensatz zu den übrigen für ihr Zustandekommen nicht der Doppelwirkung von „Ambozeptor“ und „Komplement“ bedürfen. Vergewärtigen wir uns jedoch das im vorigen für die Labwirkung der Proteasen Erörterte und versuchen wir dasselbe auf die hier vorliegenden Beziehungen zu übertragen, so erscheint das ganze Problem in einem neuen Licht und die Einheitlichkeit aller Immunkörperreaktionen liegt nahe. Hier wie dort fungiert ein proteolytisches Enzym; hier wie dort tritt neben der augenfälligen Eiweißspaltung eine Eiweißfällung auf; hier wie dort endlich kann der der ersten Spaltungsphase entsprechende Fällungsvorgang eines Aktivators eintreten, der für die tiefer gehende Spaltung notwendig ist.

Ob wie bei der Pepsinhydrolyse des Eiweiß einfache Aktivatoren, H⁺ bzw. beim Trypsin OH⁻-Ionen, in Funktion treten und ob eine Kinase mit dem hitzebeständigen „Ambozeptor“ identifiziert werden könnte, sei dahingestellt⁶⁾.

Die Ermittlung von Labferment und Labzymogen.

Wie wir im vorigen, gleichviel nach welcher Reaktion, nur den lytischen Immunkörper ermittelten, so führt uns, um zu dem gewöhn-

¹⁾ In Gegenwart des Systems Bakt. + Immunkörper bleibt die Hämolyse von Blutkörperchen durch ein hämolytisches Agens (durch Vorbehandeln eines Kaninchens mit Erythrozyten einer fremden Art erhaltenes, Blutkörperchen lösendes Serum) aus, weil das zu dieser Auflösung notwendige „Komplement“ von dem ersten System mit Beschlag belegt worden ist.

²⁾ Durch die rapide Auflösung des artfremden Eiweißes wird der Organismus mit den zum Teil giftigen Eiweißspaltprodukten (Albumosen, Peptone) überschwemmt, wodurch heftige, unter Umständen zum Tode führende Reaktionen des Organismus ausgelöst werden.

³⁾ Unter Präzipitation versteht man das gegenüber gelöstem Bazilleneiweiß in die Erscheinung tretende Ausflockungsvermögen des Immunkörpers.

⁴⁾ Agglutination bedeutet den gegenüber lebenden Bakterien sich äußernden Ausflockungsvorgang.

⁵⁾ Much, Die Immunitätswissenschaft, Würzburg 1911, S. 110, 111.

⁶⁾ Vgl. auch die Ausführungen beim Fibrinferment.

lichsten Untersuchungsobjekt, dem Magensaft, zurückzukehren, die Verfolgung der proteolytischen wie der Labwirkung auf dasselbe Enzym.

Um Labferment nachzuweisen¹⁾, fügt man zu 5—10 ccm ganz frischer, neutral reagierender, ungekochter neutralisierter Milch, oder zu einer aus Magermilchpulver²⁾ nach Fuld hergestellten, künstlichen Milch 3—5 Tropfen des sorgfältig mittels $n/10$ -Natronlauge und sehr empfindlichem Lackmuspapier neutralisierten Magensaftes und setzt das Reaktionsgemisch der Bruttemperatur aus. Nach 10—15 Minuten ist in Gegenwart von Lab Gerinnung eingetreten. Doch ist der Nachweis nur dann sicher, wenn die Probe gleichzeitig mit einer labfreien Kontrolle angesetzt wird und wenn auch nach der Gerinnung keine Säuerung der Milch eingetreten ist.

Die Prüfung auf Labzymogen bei fehlendem Labferment, z. B. im karzinomatösen oder gastritischen, immer aber nach Blum und Fuld³⁾ anaziden Magensaft⁴⁾, erfolgt nach Boas⁵⁾, indem man 10 ccm Magensaft mit Kalkwasser schwach alkalisch macht und mit derselben Menge ungekochter Milch in den Brutschrank stellt. Es soll dann, wenn Labzymogen zugegen ist, in 11—15 Minuten ein dichtes Koagulum entstehen. Auf Grund des Nachweises von Fuld, daß das Zymogen durch Kalksalze nicht in Ferment verwandelt wird, bestreitet jedoch Sahli⁶⁾ den Wert dieser Methode und nimmt nur eine Beschleunigung der Labwirkung durch vorhandene Kalksalze an.

In einwandfreier Weise läßt sich dagegen das Zymogen mittels Salzsäure aktivieren, indem man zu 2 ccm des filtrierten Magensaftes 1 ccm $n/10$ -Salzsäure hinzufügt, während einer Viertelstunde die Mischung sich selbst überläßt und hierauf mit $n/10$ -Natronlauge neutralisiert⁷⁾.

Namentlich bei quantitativen Bestimmungen darf eine solche Vorbehandlung des zu untersuchenden Magensaftes in keinem Fall unterlassen werden, wo die Reaktionsprüfung Anazidität oder auch nur Subazidität ergeben hat, denn unter solchen Bedingungen kann

¹⁾ Sahli, Lehrbuch, loc. cit. 6. Aufl., 1913, I, S. 626.

²⁾ Siehe im folgenden. Fußnote 6, S. 283.

³⁾ L. Blum u. Fuld, Berliner klin. Wochenschr. 22 (1905) Nr 44a, S. 107 (Festnummer für Ewald); Fuld, Hofmeisters Beitr. 4 (1902/03); Ergebnisse d. Physiol. 1 (1902); Münchener med. Wochenschr. 49 (1902).

⁴⁾ Boas, Zentralbl. f. med. Wissensch. (1887) 417; siehe auch Derselbe, Zeitschr. f. klin. Medizin 14 (1888) 249

⁵⁾ Boas, loc. cit. vorige Fußnote.

⁶⁾ Sahli, Lehrbuch, loc. cit. Fußnote 1, diese Seite, S. 627.

⁷⁾ Die Neutralisation erfolgt gegen sehr empfindliches Lackmuspapier. Siehe Wohlgemuth, Grundriß der Fermentmethoden, Berlin 1913, S. 167.

ein größerer oder geringerer Teil des Labs als Zymogen vorhanden sein und sich somit der Bestimmung entziehen. Man mißt dann lediglich die labende Kraft des betreffenden Magensaftes, die zu kennen natürlich klinisch von mindestens ebenso großem Interesse ist, wie die Kenntnis des maximal, unter günstigen Aktivierungsverhältnissen zur Verfügung stehenden Labs, die aber die Bestimmung dieses letzteren nicht zu ersetzen oder überflüssig zu machen vermag. Wohl aber ergänzt eine Bestimmung die andere, und es sollten daher, wo immer möglich, zwei Versuche nebeneinander, einer am unveränderten Magensaft und einer am aktivierten angesetzt werden. Hierdurch werden drei wichtige Werte erhalten. 1. Die labende Kraft, wie sie dem Magensaft wirklich zukommt; sie wird wesentlich bestimmt durch dessen Gehalt an aktivem Lab. 2. Die labende Kraft, wie sie dem Magensaft zukommt, wenn sich durch die Herstellung günstiger Aktivierungsbedingungen zu dem unter 1 genannten Wert die Labwirkung des im vorigen Fall als Zymogen enthaltenen Labs gesellt. 3. Der Differenzwert von 1 und 2, welcher der Menge des im unveränderten Magensaft enthaltenen Zymogens entspricht.

Im Harn ist das Lab überhaupt nur als Zymogen enthalten und bedarf daher zu seiner Ermittlung unter allen Umständen der vorherigen Aktivierung. Nach der Methode von Fuld und Hirayama¹⁾ werden dementsprechend 9 ccm Harn mit 1 ccm normaler Salzsäure vermischt, nach $\frac{1}{4}$ stündigem Stehen der Mischung bei Zimmertemperatur mit dem zur Neutralisation notwendigen Kubikzentimeter normaler Natronlauge und mit 1 ccm 20 %iger Chlorkalziumlösung²⁾ versetzt und nach dem Absetzen des gebildeten Niederschlags ein Reagenzglaschen mit 2 ccm Harn, ein zweites mit 1 ccm und vier weitere mit sukzessive je 0,2 ccm Harn weniger beschickt. Durch Zusatz von 0,2, 0,4, 0,6 bzw. 0,8 ccm destilliertem Wasser wird auch in diesen Gläschen das Volumen der betreffenden Harnmenge auf 1 ccm gebracht, hierauf zu jeder Probe 5 ccm Milch gefügt, die Mischungen eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen, danach gleichzeitig auf 5 Minuten in ein Wasserbad von 36—38° verbracht und dann abgekühlt. Bei normalem Labgehalt des Harns würden die Gläschen von der Harnmenge 0,6 ccm aufwärts Labung bewirken.

Einer Ermittlung der Labwirkung des Pankreassaftes hat ebenfalls, wenn der letztere das Trypsin — an dessen Vorhandensein die

¹⁾ Fuld u. Hirayama, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 10 (1912) 2.

²⁾ Der Chlorkalziumzusatz erfolgt, damit der Harn nicht der Milch die für die Koagulation notwendigen Kalziumionen entzieht.

labende Fähigkeit, wie erwähnt, gebunden ist — in der Zymogenform enthält, die Aktivierung vorauszugehen, in derselben Weise, wie dies beim Trypsin angegeben wurde. Der aktivierte Pankreassaft wird dann mit $n/10$ -Salzsäure und möglichst empfindlichem Lackmuspapier genau neutralisiert und außerdem das gerinnungsbegünstigende Kalziumchlorid der zur Verwendung kommenden Milch zugesetzt, und zwar 1 ccm einer 20 %igen Lösung pro 100 ccm Milch. Von der so behandelten Milch werden je 5 ccm zu den mit destilliertem Wasser in der gewöhnlichen Weise hergestellten Verdünnungen des aktivierten Pankreassaftes gesetzt und die Mischungen auf 24 Stunden in den Eisschrank gestellt. Wohlgemuth¹⁾ empfiehlt hierauf, jedem Gläschen $\frac{1}{2}$ ccm eines Gemisches von 10 ccm Serum + 1 ccm 20 %iger Chlorkalziumlösung zuzusetzen, um durch das Antitrypsin des Serums die tryptische Verdauung so weit herabzusetzen, daß sie nicht bei der nun folgenden Nachbehandlung der Reaktionsgemische durch Einbringen der Gläschen in ein Wasserbad von 38° während einer Viertelstunde das Parakasein zu nicht mehr koagulablen Produkten abzubauen vermag. Dann wird wiederum abgekühlt und das Gläschen aufgesucht, in welchem die Gerinnung vollständig ist.

Um das Labferment quantitativ zu bestimmen, verfährt Boas²⁾ — und in ganz analoger Weise Morgenroth³⁾ — so, daß er zu abgemessenen gleichen Volumina Milch je gleiche Mengen des vorsichtig nahezu neutralisierten Magensaftes setzt, für die einzelnen Proben steigende Magensaftverdünnungen anwendet und die Verdünnungsgrenze bestimmt, bei der noch eben Gerinnung eintritt.

Um eine Fermentschädigung zu vermeiden, läßt Morgenroth den größten Teil der Reaktion bei tiefer Temperatur (0—8°) vor sich gehen und bringt erst nach $\frac{1}{2}$ tägigem Stehen bei dieser Temperatur das Gemisch auf 32°, wobei Koagulation stattfindet.

Die Verdünnungsgrenze ist normalerweise erst bei hochgradiger Verdünnung (mehr als 100fach) erreicht, während als Zeichen der gestörten Labsekretion, die im Sinne der früheren Ausführungen der Pepsinsekretion parallel geht⁴⁾, in Fällen von Magenkarzinom, beim atrophierenden Magenkatarrh und häufig bei perniziöser Anämie die Grenze schon bei 5—10facher Verdünnung erhalten wird. Oft fehlt das labende Ferment überhaupt.

¹⁾ Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 39 (1912) 302; Derselbe, loc. cit. Fußnote 7, vorletzte Seite.

²⁾ Boas, loc. cit. Fußnote 4, S. 280.

³⁾ Morgenroth, Zentralbl. f. Bakteriöl. 26 (1899) 349.

⁴⁾ Johnson, Zeitschr. f. klin. Medizin 14 (1888) 240; Johannasson, Ebenda 17 (1890) 204; Petry, Zeitschr. f. experim. Pathol. 2 (1906) 572.

Fuld¹⁾ setzt an dieser Methode aus, daß der Einfluß der Wirkungsdauer nicht ausgeschaltet ist, so daß Proben, die viel Ferment enthalten, früher gerinnen.

Auf demselben Prinzip wie die vorigen beruhen folgende Verfahren: dasjenige von Becker²⁾ (welcher die Magensaftquantität ermittelt, die 10 ccm einer an normaler HCl³⁾ 2%igen Milch nach halbstündigem Verweilen im Eisschrank und 5 Minuten langem Erwärmen eben zu koagulieren vermag); ferner die Arbeitsweise, deren sich Madsen⁴⁾ bediente, welcher die mit gleichen Mengen Milch, aber mit verschiedenen Quantitäten Lab beschickten Probierröhrchen von Anfang an in ein Wasserbad von bestimmter Temperatur einsetzt; ferner die Methode von Blum und Fuld⁵⁾, bei der Störungen infolge von Qualitätsschwankungen der Milch durch Verwendung eines pulverförmigen Milchpräparates von konstanter Zusammensetzung vermieden sein sollen. Je 4,5 ccm einer aus diesem Präparat hergestellten künstlichen Milch⁶⁾ werden mit 0,5 ccm des unverdünnten und des in Intervallen einer geometrischen Reihe weiter verdünnten Magensaftes 2 Stunden bei 15 ° C belassen, hierauf für 5 Minuten in ein Wasserbad von 37 ° gestellt, und die größte Verdünnung aufgesucht, welche die Milch gerade noch zur Koagulation zu bringen vermag. Die betreffende Verdünnungszahl bezeichnen Blum und Fuld direkt als Labwert. Auf ähnlichen Grundlagen basiert auch die von Sahli nach einer brieflichen Mitteilung von Volhard in seinem Lehrbuch (S. 628) beschriebene sehr empfindliche Methode.

Eines anderen Maßes bedient sich Koettlitz⁷⁾, indem er die Labmenge aus der Höhe des aus einer besonders bereiteten Kaseinlösung ausfallenden Parakaseinniederschlags bestimmt.

Gesetzmäßigkeiten bei der Labwirkung.

Außer nach den im vorigen Abschnitt genannten Methoden könnte man auch direkt aus der Zeit, welche eine bestimmte Menge

¹⁾ Fuld, Biochem. Zeitschr. 4 (1907) 54.

²⁾ Becker, Hofmeisters Beitr. 7 (1906) 89.

³⁾ Der Salzsäurezusatz ist zu verwerfen.

⁴⁾ Madsen, Arrhenius' Immunochemie 1907, S. 47.

⁵⁾ L. Blum u. Fuld, Berliner klin. Wochenschr. 22 (1905) Nr. 44a; Biochem. Zeitschr. 4 (1907) 62.

⁶⁾ Es werden 3 g des Milchpulvers mit der neunfachen Wassermenge unter Umrühren während 1 Minute auf 80° gehalten und nach dem Abkühlen so viel Chlorkalzium hinzugefügt, daß eine 4%ige Chlorkalziumlösung resultiert. Wird das von Gabler-Saliter (Obergünsberg, Allgäu) in Handel gebrachte Milchpulver verwendet, so werden 10 g desselben in der 10fachen Menge Wasser von 50° C. unter Umrühren gelöst und 1/2 ccm 20%ige Chlorkalziumlösung hinzugefügt.

⁷⁾ Koettlitz, Arch. internat. Physiol. 5 (1907) 140.

Magensaft bei bestimmter Temperatur benötigt, um ein gewisses Milchquantum zu koagulieren, den Gehalt an labendem Ferment ermitteln, da die Beziehung zwischen Fermentkonzentration und Umwandlungszeit durch das Zeitgesetz der Labung in der einfachsten Weise ausgedrückt wird.

Die Umwandlungszeit wird nur durch die Umwandlung von Kasein in Parakasein bestimmt, da nur diese mit meßbarer Geschwindigkeit verläuft. Die Koagulation erfolgt demgegenüber fast momentan ¹⁾. Reichel und Spiro ²⁾ hatten dagegen angenommen, daß der zeitliche Verlauf der Labung ein einheitlicher sei.

Für die Abhängigkeit der Labwirkung von der Temperatur haben Madsen und Walbum ³⁾ die Arrheniussche Formel:

$$\frac{K_1}{K_2} = e^{\frac{\eta}{R} \cdot \frac{T_1 - T_2}{T_1 \cdot T_2}}$$

gültig befunden. η wurde dabei in drei verschiedenen Versuchen zu 58.330, 91.200 und 89.130 bestimmt. Siehe ferner über die Abhängigkeit der Labung von der Temperatur Krüger ⁴⁾.

Nach dem von Segelcke und Storch ⁵⁾ aufgefundenen und von Hansen und Soxhlet ⁶⁾ bestätigten Zeitgesetz der Labung ist das Produkt aus Fermentmenge und Gerinnungsdauer eine Konstante:

$$F \cdot t = \text{Konst.}$$

oder es besteht mit anderen Worten zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Fermentmenge direkte Proportionalität, da die Reaktionsgeschwindigkeit v der Gerinnungszeit umgekehrt proportional ist:

$$F = k \cdot \frac{1}{t} = k \cdot v.$$

Ein ganz analoges Gesetz fanden Reichel und Spiro ⁷⁾ für die Abhängigkeit des Vorgangs von der Kalziumionenkonzentration, indem die Beziehung gilt ⁸⁾:

$$\text{Ca}^{++} \cdot t = k.$$

Des weiteren haben Reichel und Spiro ⁹⁾ in einer folgenden Arbeit in Bestätigung eines Befundes von Fuld ¹⁰⁾ festgestellt, daß

¹⁾ Fuld, Hofmeisters Beitr. 2 (1902) 160

²⁾ Reichel u. Spiro, Hofmeisters Beitr. 8 (1906) 15.

³⁾ Madsen u. Walbum, Upsala Lakarefören Föih. [N. F.] 11 24, Suppl. (Festschr. f. Hammarsten); Biochem. Zentralbl. 5 (1906) 1896.

⁴⁾ Krüger, Untersuchung über d. Pankreas der Knochenfische, Inaug.-Dissert., Kiel 1904.

⁵⁾ Segelcke u. Storch, Ugeskrift for Landmaend (1870) Nr. 15.

⁶⁾ Hansen u. Soxhlet, Milch-Ztg. 6 (1877) Nr. 37, 38.

⁷⁾ Reichel u. Spiro, Hofmeisters Beitr. 7 (1905) 485.

⁸⁾ Vgl. jedoch van Dam, Zeitschr. f. physiol. Chem. 58 (1908) 295 und die früheren Ausführungen.

⁹⁾ Reichel u. Spiro, Hofmeisters Beitr. 8 (1906) 15.

¹⁰⁾ Fuld, Hofmeisters Beitr. 2 (1902) 170.

die Labwirkung a in jedem Zeitpunkt, nicht nur in demjenigen der Gerinnung, der Fermentmenge und der Labungsdauer direkt proportional ist:

$$a = F \cdot t \cdot k,$$

woraus sich ergibt:

$$\frac{a}{F \cdot t} = k$$

oder

$$F = \frac{a}{t \cdot k}.$$

Für die Praxis der Labbestimmung fällt jedoch ins Gewicht, daß das Zeitgesetz der Labung nur für das Kälberlab, das echte Chymosin, gültig ist, während das „Parachymosin“ des Menschenmagens in verdünnter Lösung viel langsamer labt, als das Zeitgesetz verlangt. Doch will einerseits Gerber (loc. cit.) auch für das Parachymosin das Zeitgesetz bei Temperaturen von 25–30° gültig befunden haben und andererseits gibt Arrhenius¹⁾ an, daß auch echte Lablösungen bei sehr starker Verdünnung die beim Parachymosin festgestellten Abweichungen zeigen²⁾.

Nach Gerber³⁾ und van Dam⁴⁾ soll dies auf einer stärkeren Schädigung beruhen, der die verdünnten Lablösungen gegenüber den konzentrierten bei langer Versuchsdauer ausgesetzt sind. Daß die Fermentkonzentration sehr wesentlich für den Grad der Fermentschädigung ist, geht auch daraus hervor, daß das labende Agens in konzentrierten Lösungen erst bei ungefähr 70° zugrunde geht, während verdünnte Kalberlablösungen bei 65° vollständig, bei 55° zu drei viertel und sofort, bei 40° im Verlauf einer Stunde der Zerstörung⁵⁾ anheimfallen⁶⁾.

Reichel und Spiro⁷⁾ fanden für hohe Labkonzentrationen wie auch bei Anwendung starker Milchverdünnungen das Gesetz von Segelcke und Storch nicht bestätigt. Sie betrachten dasselbe nur als einfachsten Spezialfall des Gesetzes, das durch die Formel ausgedrückt wird:

$$F^n \cdot T = k.$$

¹⁾ Arrhenius, Immunochemie, Leipzig 1907, S. 47.

²⁾ Koettlitz, loc. cit. vorletzte Seite Fußnote 7, gibt sogar an, daß die Labwirkung dem Schützchen Pepsin gesetz folgt.

³⁾ Gerber, Soc. Biol. 63 (1907) 575.

⁴⁾ van Dam, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64 (1910) 316.

⁵⁾ Bang, Skand. Archiv Physiol. 25 (1911) 105; Siegfeld, Milchwirtsch. Zentralbl. 3 (1907) Heft 10; Biochem. Zentralbl. 6 (1907) 2516; Bräuler, Archiv f. d. ges. Physiol. 133 (1910) 519.

⁶⁾ Abkühlung bis zur Temperatur der flüssigen Luft ist einflußlos [Chanoz und Doyon, Soc. Biol. 52 (1900) 451].

⁷⁾ Reichel u. Spiro, Hofmeisters Beitr. 5 (1904) 68, 7 (1905) 485.

Der Exponent n , welcher für Milch = 1 gesetzt werden kann, hängt von der Qualität und Quantität der im Reaktionsgemisch gleichzeitig vorhandenen Stoffe ab.

Der Tatsache, daß bei gleicher Labmenge die Differenz der Gerinnungszeiten verdünnter ¹⁾ und unverdünnter Milch der Differenz der Verdünnungszustände nahezu proportional ist, daß also die Milch um so langsamer gerinnt, je verdünnter sie ist, wird die Formel:

$$t - t' \left(\frac{M}{V - M} \right) = k$$

gereicht, worin $t - t'$ die Differenz der Gerinnungszeiten der verdünnten und unverdünnten Milch, M das Volumen der unverdünnten und V das Volumen der verdünnten Milch bedeutet.

Bei hohen Labkonzentrationen tritt dagegen gerade umgekehrt in den verdünnten Proben raschere Gerinnung ein. Zwischen beiden Extremen liegt die bei mittleren Labmengen innegehaltene breite Zone (20—90 % Milchgehalt), in der sich die Labungszeit als unabhängig von der Milchkonzentration erweist.

Daß bei diesen Beziehungen nicht der Kaseingehalt ausschlaggebend ist, zeigt der Umstand, daß zwischen Labungszeit und Kaseinmenge direkte, zwischen Labungsgeschwindigkeit und Kaseinmenge demnach umgekehrte Proportionalität besteht ²⁾.

Jedenfalls bilden die vielen komplizierenden Faktoren, die der Labgerinnung anhaften, ein sehr erschwerendes Moment für den Versuch, Chymosin und Parachymosin auf Grund der Gültigkeit oder Nichtgültigkeit des Labgesetzes zu differenzieren, und auch bei den übrigen Kriterien, welche Bang ³⁾ für eine solche Unterscheidung angegeben hat (viel größere Thermostabilität, größere Alkaliempfindlichkeit und viel stärkere Beeinflußbarkeit durch Chlorkalzium beim Parachymosin als beim Chymosin), ist mit den verschiedensten Komplikationen zu rechnen. Diese Unterscheidungsmethoden seien daher nur mit allem Vorbehalt angeführt ⁴⁾.

Die Prüfung auf ungleiche Temperaturempfindlichkeit als Unterscheidungsmerkmal von Chymosin und Parachymosin wird nach Bang (loc. cit.) in der Weise ausgeführt ⁵⁾, daß die zu untersuchende, gegen Lackmoid genau neutralisierte Lösung bei 70° — der Zerstörungstemperatur des Chymosins — während einer Minute gehalten wird.

¹⁾ Die Verdünnungen werden mit Molke oder physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

²⁾ Fuld, *Ergebn. d. Physiol.* **1** (1902) 492.

³⁾ Bang, *Archiv f. d. ges. Physiol.* **79** (1900) 425.

⁴⁾ Siehe ferner die früheren Ausführungen in diesem Abschnitt.

⁵⁾ Siehe auch Wohlgemuth, *Grundriß der Fermentmethoden*, Berlin 1913, S. 177.

Hierauf kühlt man ab und stellt fest, ob eine nennenswerte Labwirkung vorhanden ist. Ist dies der Fall, so käme dieselbe dem Parachymosin zu, welches erst bei 75° der Zerstörung anheimfällt.

Zur Prüfung auf die Gültigkeit des Labgesetzes wird die Gerinnungszeit nach Fuld¹⁾ ermittelt. Danach werden je 5 ccm im Wasserbad auf 40° vorerwärmter Milch zu einer geeigneten, durch Vorversuche ermittelten Quantität²⁾ der im Wasserbad von 40° befindlichen Fermentproben auf einmal zugesetzt, die Gläschen beständig im Wasserbade umgeschwenkt und der Moment notiert, in dem sich die an den Gefäßwänden herunterlaufende Milch gerade in feine Gerinnsel und Serum zu scheiden beginnt.

Nachdem so die vom Moment des Vermischens bis zum Moment der Gerinnung verstreichende Zeit — eben die Gerinnungszeit — bei allen Proben festgestellt ist, wird mit der zu den Versuchen benutzten Anzahl Kubikzentimeter der Lablösung multipliziert. In derselben Weise werden Versuchsserien mit der halben und der viertels Fermentmenge angesetzt, und auch bei diesen das Produkt Gerinnungszeit-Labmenge ermittelt. Erweist sich dieses Produkt, wie es das Zeitgesetz verlangt, als konstant, so würde es sich nach Bang um Chymosin, anderenfalls um Parachymosin handeln.

In derselben Weise wird auch die Prüfung des Einflusses löslicher Kalksalze auf die Gerinnungszeit ausgeführt, mit dem einen Unterschied, daß jeder Milchprobe vor dem Erwärmen ein Tropfen 10 %iger Kalziumchloridlösung hinzugefügt wird. Wenn die Gerinnungszeiten bei den Chlorkalzium enthaltenden Proben annähernd dieselben sind wie bei den ohne diesen Zusatz erhaltenen, so würde Chymosin in der Lösung anzunehmen sein, bei abweichenden Resultaten dagegen Parachymosin. Bei der Untersuchung der Alkaliempfindlichkeit wird in ähnlicher Weise mit Basenzusätzen verfahren.

Man kann zum Schluß die Frage aufwerfen, ob ein striktes Festhalten an der unitarischen Auffassungsweise nicht dazu führen muß, den Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung des Labs jede Existenzberechtigung abzuspochen. Dies scheint mir nicht der Fall zu sein, und es wäre auch sehr zu bedauern, wenn sich die Unitarier zum Niederreißen an sich interessanter Methoden, die zum festen Bestand der analytischen Chemie gehören, verstehen würden. Denn wenn wir auch die Labwirkung ganz in derjenigen des Pepsins aufgehen lassen, so verdienen diese Methoden zum minde-

¹⁾ Fuld, Hofmeisters Beitr. 2 (1902) 169.

²⁾ Die 5 ccm Milch sollen binnen 2—3 Minuten gerinnen.

sten als eine andere Form der Pepsin- oder auch der Trypsinbestimmung erhalten zu bleiben. An und für sich mag dies ja nicht gerade als ein besonderer Vorteil erscheinen, da wir über direkte Pepsinbestimmungsmethoden verfügen, die einer Ermittlung des Pepsins auf Grund seiner mit dem kolloiden Fällungsprozeß gekoppelten kaseinspaltenden Wirkung an Exaktheit überlegen sind. Dafür ist aber der Labnachweis einfacher und rascher auszuführen und zeigt eine höhere Empfindlichkeitsgrenze als der Pepsinnachweis¹⁾. Zudem muß bei der Ermittlung des Pepsins auf diesem mehr indirekten Wege im Auge behalten werden, daß wir nur die durch den Sekundärvorgang der Parakaseinfällung scharf begrenzte Phase des fermentativen Eiweißabbaus in Händen haben. Bedeutet dies für die Beurteilung der gesamten verdauenden Kraft eines Magensafts eine Beschränkung, geradeso, wie dies für die Beurteilung der Gesamtwirkung des Trypsins auf Grund seines Verhaltens gegenüber den Polypeptiden der Fall ist, so liegt doch anderseits im wesentlichen gerade in diesem Umstand die Bedeutung begründet, welche einer Ermittlung der labenden Wirkung für die Beurteilung eines Magensaftes zukommt; denn es ist damit die Möglichkeit gegeben, den Einfluß der Proteasen gleichsam etappenweise zu verfolgen und verschiedene Phasen des Eiweißabbaus auseinanderzuhalten.

Das früher einfach als proteolytische Phase bezeichnete Stadium des Eiweißabbaus würde sich demnach nochmals zergliedern lassen und geradeso, wie wir dies für das peptische Stadium der Trypsinspaltung näher ausgeführt haben, könnte man auch hier durch Vergleich des ganzen Reaktionsverlaufs mit der labenden Teilphase in differenzierter Weise Schlüsse auf die Angriffsfähigkeit der Proteasen gegenüber dem Substrate ziehen.

Es ist sehr wohl denkbar, daß eine zu Beginn der Verdauung nur träge auf Eiweiß einwirkende Protease²⁾ die einmal gebildeten ersten Umwandlungsprodukte rasch weiter zu verändern und dadurch die anfängliche Langsamkeit wieder wettzumachen vermag, während eine andere Protease umgekehrt im Frühverlauf der Spaltung eine rasche, im Spätverlauf eine langsame Einwirkung auf das zu verdauende Material besitzt. In beiden Fällen kann das Endresultat dasselbe sein. Vergleicht man nun aber nicht die Gesamtverdauung,

¹⁾ Siehe Sahli, loc. cit. S. 230, Fußnote 1, S. 628.

²⁾ Ob diese Unterschiede in Ungleichheiten der Natur der Proteasen selbst und des Substrates begründet sind, oder ob nur aktivierende oder paralyisierende Begleitkörper in Frage kommen, ist jedenfalls zur Stunde nicht zu entscheiden.

sondern nur die Labwirkung der beiden fermentführenden Flüssigkeiten miteinander, so tritt sofort der Unterschied zutage. Zwischen der Gesamtspaltung des Eiweißes unter dem Einfluß des Pepsins oder Trypsins und dessen Labwirkung macht sich dann eine mehr oder weniger beträchtliche Diskrepanz geltend.

Die Auffindung solcher Unterschiede kann für die Kenntnis des Eiweißabbaus von Nutzen sein; sie wird auch praktisches Interesse erlangen, wenn sich herausstellt, daß unter pathologischen Bedingungen die beiden unter dem Einfluß des Fermentes stehenden Verdauungsstadien in ungleicher Weise in Mitleidenschaft gezogen sind.

Vor allem läßt die Berücksichtigung der Mehrphasigkeit des Verdauungsprozesses auch eine fehlende Parallelität zwischen der nach den gewöhnlichen Pepsinbestimmungsmethoden ermittelten totalen verdauenden Kraft und der partiellen, an der Labwirkung gemessenen durchaus natürlich erscheinen, ohne daß zur Erklärung dieser von Unitariern und Dualisten so heiß umstrittenen Differenz zwei prinzipiell verschiedene Enzyme, Pepsin und Chymosin, herangezogen werden müßten.

Anwendung der Labwirkung zur Substratbestimmung.

Wie der Bestimmung der Labwirkung, ungeachtet des über die Identifizierung von Pepsin und Chymosin entfachten Streites, ein reeller Wert zugeschrieben werden muß, so leistet sie auch als Hilfsmittel zur Substratbestimmung dem Analytiker wichtige Dienste.

Die Bestimmung des Käsestoffs. Um das Kasein einer Milchprobe zu bestimmen, gehen Manetti und Musso¹⁾ so vor, daß sie 50 ccm oder 50 g Milch in einer Porzellanschale auf 39—40° erwärmen²⁾ und einige Tropfen einer Glycerinablösung in solcher Menge hinzufügen, daß die Gerinnung nach höchstens 10—15 Minuten eintritt. Dann rühren sie um, und bis zur eingetretenen Gerinnung wird die Probe bei 35—40° belassen. Ist die Koagulation beendet, was man beim Spalten des Gerinnsels mittels eines Spatels am raschen Hervorquellen und der Zitronenfarbe des Serums erkennt, so wird das Koagulum sorgfältig in kleine Würfel zerschnitten, abfiltriert und hierauf mit lauwarmem Wasser ausgewaschen, bis das Waschwasser Fehlingsche Lösung nicht mehr reduziert. Dann gibt man einige Kubikzentimeter eines Alkohol-Aethergemisches auf das Filter und hierauf Portionen von je 40—50 ccm absolutem Alkohol, den man zuvor in derselben mit einer Glasplatte

¹⁾ Manetti u. Musso, Zeitschr. f. anal. Chem. 16 (1877) 402.

²⁾ Durch Einstellen in ein Wasserbad von 50—60°.

bedeckten Schale zum Kochen erhitzt hat. Der so bis zur gänzlichen Entfettung behandelte, vollständig weiße Filterrückstand wird nun nach nochmaligem Auswaschen mit Aether samt dem Filter auf einer Glasplatte ausgebreitet, vom Filter abgehoben und mit den in der Schale zurückgebliebenen Käsestoffkörnern auf einem Uhrglas bei 115° getrocknet und gewogen. Durch Multiplikation des Gewichts mit 2 erhält man den in 100 Teilen enthaltenen, durch Lab gewinnbaren Käsestoff, vermehrt um die unlöslichen Phosphate des Koagulums. Durch die Aschenbestimmung erfährt man das Gewicht dieser letzteren und durch Abzug vom Gesamtgewicht die Menge des Käsestoffs allein.

Das Fibrinferment (Thrombase, Thrombin).

Historisches. Von Buchanan¹⁾ wurde zuerst das bei der Blutgerinnung in Wirkung tretende Prinzip aufgefunden und von Alexander Schmidt²⁾ als Fibrinferment oder als Thrombin bezeichnet.

A. Schmidt war der Urheber der Theorie, daß zwei im Blute vorgebildete Stoffe, die fibrinogene und die fibrinoplastische Substanz (Fibrinogen und Paraglobulin), unter dem Einfluß des Fibrinferments miteinander in Reaktion treten. Das Ferment sollte im wesentlichen leukozytären Ursprungs sein, doch auch aus anderen Zellen hervorgehen können. Demgegenüber betonte Hammarsten³⁾ die Entbehrlichkeit des Paraglobulins und die Notwendigkeit löslicher Kalksalze für die Gerinnung. Lilienfeld (loc cit.) stellte dann der synthetischen Theorie A. Schmidts die noch eingehender besprochene Spaltungstheorie gegenüber, wonach das Fibrinogen unter dem Einfluß von Säuren, namentlich der aus den Leukozytenkernen stammenden Nukleinsäure, in das albumoseartige Thrombosin gespalten werden sollte, welches sich dann mit Kalksalzen zu dem unlöslichen, mit Fibrin identischen Thrombosinkalk umsetzen würde. Demgegenüber sprach Arthus⁴⁾ das Fibrin als Fibrinogenkalk an. Auch Pekelharing⁵⁾

¹⁾ Buchanan, Phil. Soc. Glasgow 1844.

²⁾ Alexander Schmidt, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1861) 682. Pflügers Archiv 6 (1872) 413, 11 (1875) 291, 515, 13 (1876) 93; Die Lehre von den fermentativen Gerinnungsvorgängen, Dorpat 1876; Zur Blutlehre, Leipzig 1892; Weitere Beiträge zur Blutlehre, Wiesbaden 1895; siehe auch die Arbeiten seiner Schüler: Samson-Himmelstjerna, Dissert., Dorpat 1882; Rauschenbach, Dissert., Dorpat 1882; Grohmann, Dissert., Dorpat 1884.

³⁾ Hammarsten, Nova acta Soc. scient. Upsaliensis [3] 10 (1875) 1; Upsala Läkaref. Föih. (1876); Malys Jahrb. 6 (1877) 13; Pflügers Archiv 14 (1876) 211, 17 (1877) 413, 18 (1878) 38, 19 (1879) 563, 22 (1880) 431, 30 (1883) 437.

⁴⁾ Arthus, Thèse Paris 1890; Arthus u. Pagès, Arch. Physiol. norm. et Pathol. [5] 2 (1890) 739; Arthus, Ebenda (1894) 252, (1896) 47.

⁵⁾ Pekelharing, Festschr. f. Virchow 1 (1891).

vertrat die Ansicht, daß das Fibrin als eine Eiweißkalkverbindung aufzufassen sei, geradeso wie man dies für das Parakasein annahm, obschon A. Schmidt inzwischen den Nachweis erbracht hatte, daß für den Vorgang der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin Kalziumsalze nicht notwendig sind ¹⁾. Doch erkannte Pekelharing zugleich die Bedeutung, welche den Kalksalzen bei der Aktivierung des Zymogens zukommt, und vermutete auch für diesen Vorgang einen Eintritt von Kalzium in das Molekül des Zymogens. Hammarsten ²⁾ hat dann die Sachlage völlig geklärt und es in meisterhafter Weise verstanden, aus dem großen Ideen- und Tatsachenmaterial der früheren Zeit den richtigen Kern herauszuschälen. Es fielen alle Vorstellungen, die mit dem Fibrin als einer Kalkverbindung rechneten. Demgegenüber blieb die Erkenntnis Alexander Schmidts bestehen, daß kalkfreies Fibrinogen in Gegenwart von kalkfreiem Fibrinferment zu gerinnen vermag, und die von diesem Forscher herrührende Vorstellung über den Ursprung der Thrombase. Von Pekelharing (loc. cit.) ging in den bleibenden Bestand der Wissenschaft die Angabe über, daß Kalziumsalze, die nach Hammarsten (loc. cit.) nur durch Strontiumsalze vertreten werden können, für die Ueberführung des Zymogens in aktives Ferment notwendig sind. Immerhin scheint es, daß in der Hammarstenschen Theorie nicht alle Momente Berücksichtigung gefunden haben, welche in den Gerinnungsprozeß hineinspielen. Vor allem sind es Angaben von A. Schmidt, welche von der modernen Forschung wieder hervorgeholt worden sind. So hatte Schmidt festgestellt, daß Alkali instande ist, aus inaktivem Serum ohne die Gegenwart von Kalziumsalzen Ferment in Freiheit zu setzen, und Morawitz ³⁾, Fuld und Spiro ⁴⁾, sowie Abderhalden ⁵⁾ führen dies auf einen der Aktivierung des Zymogens entgegengesetzten Vorgang, auf die Reaktivierung von inaktiv gewordenem Fibrinferment zurück, wobei Morawitz ⁶⁾, Pekelharing ⁷⁾ und Mellanby ⁸⁾ an die Zersetzung einer Verbindung zwischen dem Ferment und einem Hemmungskörper denken. Fuld (loc. cit.) bezeichnet diese zu aktivierende Verbindung als Metazym, Morawitz als Metathrombin. Eine andere Angabe A. Schmidts von dem Vorhandensein einer „zymoplastischen Substanz“ hat ebenfalls in den Untersuchungen der genannten modernen Forscher und in denjenigen von Nolf ihre Auferstehung erlebt (siehe näheres darüber im folgenden).

Theoretisches über das Fibrinferment.

Der gerinnungsbeschleunigende Einfluß des gleich den anderen Enzymen schon in außerordentlich geringer Menge wirksamen Fibrin-

¹⁾ Siehe auch Arthus, Soc. Biol. 53 (1901) 1024

²⁾ Hammarsten, loc. cit. vorige Seite Fußnote 3.

³⁾ Morawitz, Hofmeisters Beitr. 4 (1903) 381; Archiv f. klin. Medizin 79 (1904) 1, 80 (1904) 340; Blutgerinnung, in Oppenheimers Handb. d. Biochemie 2, Jena 1908.

⁴⁾ Fuld, Zentralbl. f. Physiol. 17 (1903) 529; Fuld u. Spiro, Hofmeisters Beitr. 5 (1904) 171.

⁵⁾ Abderhalden, Ebenda (1911) 22.

⁶⁾ Morawitz, loc. cit. diese Seite, Fußnote 3.

⁷⁾ Pekelharing, Biochem. Zeitschr. 11 (1908) 1.

⁸⁾ Mellanby, Journ. Physiol. 38 (1908) 28, 441.

fermentes steht in innigstem Zusammenhang mit der Einwirkung, welche dasselbe auf das Fibrinogen¹⁾, einen typischen Bestandteil des Blutplasmas, ausübt, eine Einwirkung, welche sich durch Koagulation dieses Eiweißkörpers verrät. Das Fibrinferment spielt schon rein äußerlich betrachtet, die nämliche Rolle für das Blut, wie das Labferment für die Milch. In dem einen Saft ist es das Fibrinogen, in dem anderen das Kasein, welches von der mit einer Ausflockung einhergehenden Umwandlung betroffen wird. Aber die Analogie scheint über die äußerliche Erscheinungsform hinauszugehen. Wenn auch so mancher Punkt in der Blutgerinnungsfrage noch der Aufklärung harrt, ja wenn sogar auf Grund der nicht nachweisbaren Wirkungssteigerung mit der Temperaturerhöhung²⁾ und des von Stromberg³⁾ und Howell⁴⁾ behaupteten, wenn auch keineswegs erwiesenen Verbrauchs⁵⁾ der Thrombase infolge einer Teilnahme an der Reaktion, sowie auf Grund der zwar von Bordet und Delange⁶⁾, Collingwood und Mac Mahon⁷⁾ be-

¹⁾ Frédéricq, Untersuchungen über die Konstitution des Blutplasmas, Gaut 1878; Ueber die Abnahme der Gerinnbarkeit des reinen Fibrinogens durch chemische Behandlung, siehe Leo Loeb, Biochem. Zentralbl. 6 (1907) 902.

²⁾ Stromberg, Biochem. Zeitschr. 37 (1911) 171; Landsberg, Ebenda 50 (1913) 245, welcher für diese von ihm bei der Einwirkung von Thrombase auf Plasma ebenfalls beobachtete Erscheinung Adsorptionen verantwortlich macht, nimmt trotzdem Fermentnatur des Prozesses der Blutgerinnung an.

³⁾ Stromberg, loc. cit. vorige Fußnote.

⁴⁾ Howell, Amer. Journ. Physiol. 26 (1910) 453, 29 (1911) 187, 31 (1912) 1.

⁵⁾ Nach Foà, Arch. Fisiol. 10 (1912) 479, handelt es sich nicht um einen schon von Alexander Schmidt (loc. cit.) bestrittenen Verbrauch nach stöchiometrischen Verhältnissen, sondern lediglich um eine, gerade bei geringen Fermentmengen besonders fühlbare, die Erscheinung der partiellen Gerinnung (Howell, Stromberg) ausreichend erklärende Adsorption [siehe auch Gessard, Compt. rend. 150 (1900) 1617] des Fibrinfermentes an das Gerinnsel, aus welchem letzterem es, trotz den für eine Extraktion denkbar ungünstigsten Verhältnissen, wie sie beim Fibrin vorliegen, teilweise auch wieder zurückgewonnen werden kann. So hat Howell (loc. cit.) selbst ein besonders reines Thrombinferment dadurch erhalten, daß er Fibrin so lange wusch, bis es keine Blutkörperchen mehr enthielt, hierauf 8%ige Kochsalzlösung während 3 Tagen im Eisschrank auf dasselbe einwirken ließ und dann mit viel Chloroform so oft schüttelte, bis ein thermostabiles Präparat resultierte, das durch kurze Dialyse und Verdunsten der Lösung im inneren Gefäß des Dialysators bei niedriger Temperatur noch von einem Teil der begleitenden Salze gereinigt werden konnte.

⁶⁾ Bordet u. Delange, Ann. Inst. Pasteur 26 (1912) 657; siehe ferner Dieselben, Bull. Acad. méd. Belgique 25 (1911) 568; Bull. Soc. Sciences méd. et nat. de Bruxelles 69 (1911) 3 und Oktober 1912.

⁷⁾ Collingwood u. Mac Mahon, Journ. Physiol. 45 (1912) 119; vgl. auch Collingwood, Ebenda 38 (1909); Proc. Physiol. Soc., 15. Mai 1909, halten thermostabile Thrombasepräparate für Kinase.

strittenen Thermostabilität¹⁾ der weitgehend gereinigten²⁾ Thrombase³⁾ die Fermentnatur des Blutgerinnungsprozesses in Abrede gestellt worden ist⁴⁾, so deuten doch alle Zeichen auf eine tiefe, innere Wesensverwandtschaft der beiden Prozesse hin.

Für den Einfluß des Labs haben wir gesehen, daß die der Gerinnung vorausgehende Umwandlung des Kaseins in Parakasein als ein wenig eingreifender Spaltungsprozeß aufgefaßt werden muß. Es gilt nun zu prüfen, ob die Gründe, welche dort zu einer solchen Annahme führten, auch für den durch das Fibrinferment beschleunigten Prozeß Geltung besitzen.

Da hat sich nun zuerst herausgestellt, daß die Fibrinquantität, welche sich bei der Gerinnung bildet, immer, und zwar in konstantem Verhältnis, kleiner ist als das vorhandene Fibrinogen⁵⁾, daß, wie Hammarsten⁶⁾ und Schmiedeberg⁷⁾ fanden, eine geringe Menge als Fibringlobulin bezeichnete Proteinsubstanz der Lösung verbleibt und daß, wie Heubner⁸⁾ zeigte, Fibrin, Fibrinogen und Fibringlobulin chemisch ungleichartig sind.

Die von Reye⁹⁾ auf Grund der gleichen Sättigungsgrenzen mit Ammoniumsulfat behauptete Identität des „Fibringlobulins“ mit dem Fibrinogen ist nach Hammarsten¹⁰⁾ unhaltbar, da die Koagulationstemperatur des Fibrinogens um 10°

¹⁾ Rettger, Amer. Journ. Physiol. **24** (1909) 406; Zentralbl. f. Physiol. **23** (1909) 340; Howell, loc. cit. Fußnote 4, vorige Seite.

²⁾ Siehe Howell, loc. cit. Fußnote 4, vorige Seite.

³⁾ Die Thermostabilität der meisten Fermente haftet zweifellos meist an deren Eiweißgehalt, ist also sekundärer Natur. Mit dem Nachweis, daß durch weitgehende Reinigung manche Fermente ihres Eiweißgehaltes beraubt werden können, ohne ihre fermentative Wirkung zu verlieren, verliert auch die Thermostabilität als Charakteristikum der Fermente die Existenzberechtigung; denn es ist zu erwarten, daß eiweißfreie Fermente thermostabil sind. Die Angabe von Howell, daß die Thrombase den Charakter eines Proteins besitzt, würde Thermostabilität vermuten lassen.

⁴⁾ Siehe außer den genannten Forschern Woldrigde, Die Gerinnung des Blutes, Leipzig 1891; Nolf, Archive internat. Physiol. **3** (1905) 1, **4** (1906) 165, **6** (1908) 1, 115, 306, **7** (1909) 280, 379, 422; Arch. Fisiol. **7** (1909); Ergebn. d. inneren Medizin **10** (1913) 250.

⁵⁾ Nach Heubner, Archiv für exp. Pathol. u. Pharmakol. **49** (1903) 229 entstehen aus 100 Teilen Fibrinogen immer 49 Teile Fibrin.

⁶⁾ Hammarsten, Pflügers Archiv **22** (1880) 481, **30** (1883) 437; siehe auch die auf Hammarsten bezüglichen Fußnoten auf folgender Seite.

⁷⁾ Schmiedeberg, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **39** (1897) 1.

⁸⁾ Heubner, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **49** (1903) 229.

⁹⁾ Reye, Ueber Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens, Dissert., Straßburg 1898.

¹⁰⁾ Hammarsten, loc. cit. im folgenden.

niedriger liegt als diejenige des bei 64–66° gerinnenden Fibringlobulins. Hammarsten¹⁾ glaubte eher, daß das Fibringlobulin mit gelöst bleibendem Fibrin zu identifizieren sei. Beide Ansichten sind durch die Heubnersche Untersuchung²⁾ erschüttert worden.

Entgegen seiner wechselnden früheren Auffassung³⁾ neigt Hammarsten in der Folge wieder der zuerst von Denis⁴⁾, später von Frederikse⁵⁾, Lilienfeld⁶⁾ und Schmiedeberg (loc. cit.) vertretenen Ansicht zu⁷⁾, wonach das Fibrinogen unter Abspaltung des löslichen „Fibringlobulins“ in Fibrin übergehen würde⁸⁾, eine Umwandlung, die der Spaltung des Kaseins in Molkenalbumose und Parakasein unter dem Einfluß des Labferments entspräche. Immerhin betont Hammarsten die Schwierigkeiten, die einer endgültigen Entscheidung darüber im Wege stehen, ob das Fibringlobulin erst aus dem Fibrinogen abgespalten wird oder ob es schon vorgebildet demselben nur als Verunreinigung anhaftet, wie dies Huiskamp⁹⁾ annimmt. Hier müssen andere Gründe, welche für eine Spaltung sprechen, ergänzend eingreifen.

Vor allem wird man dabei zu prüfen haben, ob der Abbauprozess dessen erste Phase nach dieser Auffassung die Ursache der Blutgerinnung wäre, durch Produkte, die bei jeder Eiweißspaltung im Reaktionsgemisch auftreten, gehemmt werden kann. Tatsächlich hat sich nun auch herausgestellt, daß geradeso wie bei der hier als der Fibrinogenumwandlung analog vorausgesetzten Spaltung des Kaseins zu Molkenalbumose und Parakasein und deren Folgeerscheinung, der Koagulation, auch die Blutgerinnung einer Hemmung durch Albumosen und Peptone fähig ist. Daher hemmen Peptone enthaltende Materien, Extrakte von Geweben, Askarisextrakte¹⁰⁾, autolysierte Organe¹¹⁾, Serum und Plasma¹²⁾.

¹⁾ Hammarsten, loc. cit. Fußnote 3, diese Seite.

²⁾ Heubner, loc. cit. Fußnote 5, vorige Seite.

³⁾ Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22 (1896) 333, 28 (1899) 98; siehe auch Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, 1900, S. 161.

⁴⁾ Denis, Mémoires sur le sang, Paris 1859.

⁵⁾ Frederikse, Zeitschr. f. physiol. Chem. 19 (1894) 143.

⁶⁾ Ueber Lilienfelds, Zeitschr. f. physiol. Chem. 20 (1894) 89, von der hier dargelegten abweichende Auffassung siehe S. 290.

⁷⁾ Siehe Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chem., Wiesbaden 1904, S. 148.

⁸⁾ Huiskamp, siehe folgende Fußnote.

⁹⁾ Huiskamp, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44 (1905) 182, 46 (1905) 273.

¹⁰⁾ Emile-Weil u. Boye, Compt. rend. Soc. Biol. 69, 284.

¹¹⁾ Conradi, Hofmeisters Beitr. 1 (1902) 136; Doyon, Journ. Physiol. Pathol. gén. 14 (1912) 229; Doyon, Dubrulle u. Sarvonat, Soc. Biol. 73 (1912) 546, 644, 720.

¹²⁾ Blaizot, Compt. rend. Soc. Biol. 70 (1911) 560, 71 (1911) 511, 534; Murschew, Archiv f. klin. Medizin 80 (1904) 187

Mit Rücksicht auf das „Fibringlobulin“ ist der Umstand bemerkenswert, daß die gerinnungshemmenden Albumosen¹⁾ dem Typus der Heteroalbumose angehören, die dem nativen Eiweiß noch außerordentlich nahe steht und mit den Globulinen wichtige Eigenschaften gemein hat. Ihre Koagulationstemperatur hält die Mitte zwischen derjenigen des Fibrinogens und des Fibringlobulins. Inwiefern die Erhöhung der Koagulationstemperatur bei der vermuteten Umwandlung des Fibrinogens in Fibringlobulin zugunsten der Spaltungstheorie mit herangezogen werden kann, sei dahingestellt. Zum mindesten spricht aber die hierdurch zum Ausdruck kommende Verminderung des Koagulierungsvermögens eher für als gegen den Uebergang eines höher molekularen Komplexes in einen einfacher gebauten.

Das Gegenstück zu der Hemmung der Fibringerinnung durch Albumosen und Peptone bildet die nicht minder zugunsten der Spaltungstheorie sprechende, von Dastre²⁾ als Fibrinolyse bezeichnete Erscheinung, daß das Fibrin in Berührung mit dem Blut, aus welchem es hervorgegangen ist, einer allmählichen Lösung verfällt, ein Vorgang, der kaum anders denn als eine Verdauung gedeutet werden kann³⁾, und auch von Nolf⁴⁾, der hierfür sein Thrombozym verantwortlich macht, so gedeutet worden ist. Es handelt sich also um einen ganz ähnlichen Befund wie bei der nach der Gerinnung fortschreitenden Wirkung des labenden Enzyms.

Auf der ganzen Linie begegnen wir also bei der Blutgerinnung denselben Momenten, die auch bei der Milchgerinnung als wesentliche Stützpunkte der Spaltungstheorie betrachtet werden konnten. Nur über eine kurz vor der Gerinnung vor sich gehende, für die Annahme einer Spaltung sehr wesentlich in Betracht fallende Aenderung der Viskosität finden sich im Gegensatz zu der auch nach dieser Richtung hin genau studierten Labwirkung keine Angaben. Dagegen wurde der Einfluß des Gerinnungsvorganges auf die elektrische Leitfähigkeit

¹⁾ Daß nicht alle Albumosen und Peptone hemmen, zeigt der Befund von Zunz, Soc. Biol. 73 (1912) 50, daß sich der wirksame Hemmungskörper des Wittepeptons durch absoluten Alkohol eliminieren läßt.

²⁾ Dastre, Arch. Physiol. [5] 5, 6; siehe auch Derselbe, Ebenda [5] 7, sowie Arthus u. Hubert, Ebenda [5] 5; zitiert nach Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chem., S. 146.

³⁾ Vgl. auch den Befund von Green, Journ. Physiol. 8, zitiert nach Hammarsten, loc. cit. Fußnote 7, vorige Seite, und Dastre, loc. cit. Fußnote 2, diese Seite, daß bei der Lösung des Fibrins zwei Globuline entstehen.

⁴⁾ Nolf, loc. cit. Fußnoten 4, S. 293 u. 2, S. 300 u. 301; siehe ferner de Waele, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 16 (1913) 311; Biochem. Zentralbl. 14, 2611.

von Chanoz und Doyon¹⁾, Frank²⁾ und Samojloff³⁾ geprüft, ohne daß bei diesen Arbeiten ein positives Resultat zu verzeichnen gewesen wäre. Auf Grund des Hauptprozesses konnte ein solches auch gar nicht erwartet werden, da die mit dem Gerinnungsvorgang wie Ursache und Wirkung zusammenhängende Spaltung so wenig eingreifend ist, daß das Ionisierungsvermögen der neugebildeten, noch im Gebiet der Eiweißkörper liegenden Stoffe nicht wesentlich von demjenigen des Ausgangsmaterials, des Fibrinogens, abweichen dürfte. Jedenfalls kann man aber diese negativen Befunde nicht gegen die Spaltungstheorie ins Feld führen⁴⁾, die zwischen den beiden wichtigsten Koagulasen die Brücke schlägt und auch das Fibrinferment in die Reihe der Proteasen verweist.

Die Analogie zwischen dem labenden und dem blutgerinnenden Enzym erstreckt sich bis zu einem gewissen Grad auch auf den Sekundärvorgang, die Koagulation, welche hier wie dort als Ausflockung eines Kolloids⁵⁾ in die Erscheinung tritt. Kalziumsalze, an deren Gegenwart die Ausflockung des Kaseins gebunden ist, wirken auch hier in einem gewissen Konzentrationsintervall begünstigend auf die kolloide Fällungsreaktion, doch ist dies nur ihre Nebenfunktion⁶⁾. Die Hauptrolle spielen dieselben bei der Aktivierung der Prothrombase (Prothrombin) oder dem Thrombogen, der Vorstufe des Fibrinferments, wie dies Hammarsten⁷⁾ gegenüber den älteren Anschauungen über die Funktion der Kalziumsalze beim Gerinnungsvorgang sichergestellt hat.

Nur das ionisierte Kalzium kommt in Betracht, denn auch Verbindungen, welche das Kalzium nicht zu fällen vermögen, wie die Ziträte, wirken gerinnungshemmend, wenn sie, wie Sabbatani⁸⁾ gezeigt hat, die Kalziumsalze in eine nicht ionisierbare Form überführen. In größeren Dosen wirken Kalziumsalze nach Hammarsten⁹⁾ hemmend auf den Sekundärvorgang¹⁰⁾.

¹⁾ Chanoz u. Doyon, Journ. Physiol. 2 (1900) 388.

²⁾ Frank, Amer. Journ. Physiol. 14 (1905) 466.

³⁾ Samojloff, Biochem. Zeitschr. 11 (1908) 210.

⁴⁾ Vgl. Oppenheimer, Fermente, Bd. 2, Leipzig 1913, S. 647.

⁵⁾ Vgl. Friedemann u. Friedenthal, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 3 (1906) 73; die Arbeit von Iscovesco, Compt. rend. Soc. Biol. 60 (1906) und folgende Bände; Nolf, loc. cit. s. Fußnote 4, vorige Seite.

⁶⁾ Siehe auch Stassano u. Daumas, Compt. rend. 150 (1910) 987.

⁷⁾ Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22 (1896), 333 28 (1899) 98.

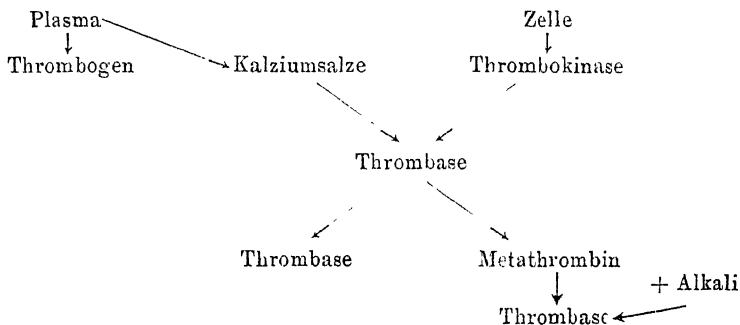
⁸⁾ Sabbatani, Arch. ital. Biol. 39 (1903) 333.

⁹⁾ Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28 (1899) 98.

¹⁰⁾ Ueber die Wirkung anderer Kationen siehe Bordet u. Gengou, Ann. Inst. Pasteur 15 (1901) 129, 17 (1903) 882, 18 (1904) 26, 98; Buglia, Arch. Fisiol. 3 (1906) 247.

Hier stoßen wir auf eine frappierende Analogie mit der an die tryptische Spaltung geknüpften Labwirkung, für welche Delezenne¹⁾ (bei Versuchen an inaktivem Fistelsaft) die Aktivierbarkeit durch Kalziumsalze feststellen konnte. Bei dem an Pepsin gebundenen labenden Einfluß sind demgegenüber die Kalziumsalze wirkungslos.

Die Aktivierbarkeit des Thrombogens zur Thrombase durch Kalziumsalze stellt zugleich auch eine direkte Verbindung zwischen dem Fibrinferment und den Tryptasen her. Es ist diese Analogie um so bemerkenswerter, als sie offenbar nur einen Punkt eines auf der ganzen Linie vergleichbaren komplizierten Aktivierungsmechanismus darstellt. Derselbe ist für die Fibringerinnung von Morawitz²⁾ und Fuld³⁾ entdeckt worden, indem dieselben einen auf das Thrombogen in Gegenwart von Kalziumsalzen einwirkenden Aktivator, von ihnen Thrombokinase genannt, in Gewebesäften auffanden. Nach diesen Forschern kommt es überhaupt nur durch die gleichzeitige Gegenwart der drei Stoffe Thrombogen, Thrombokinase und Kalziumsalze zu der Bildung von wirksamem Ferment. Diese Bedingungen sind aber erst außerhalb der Blutbahn erfüllt; im strömenden Blut bleibt dagegen die Gerinnung wegen des Mangels an Thrombokinase aus, trotzdem Thrombogen und Kalziumsalze vorhanden sind. Die einzelnen Faktoren wirken nach Morawitz entsprechend dem folgenden Schema zusammen:



An Stelle der Morawitzschen Ausdrucksweise, daß das aktive Fibrinferment durch den Zusammentritt von Thrombogen, Thrombo-

¹⁾ Delezenne, Soc. Biol. 63 (1907) 98, 187, 274; über die Aktivierung des Trypsins selbst durch Kalziumsalze siehe Derselbe, Ebenda 59 (1906) 476, 477, 523, 614, 60 (1906) 1070, 63 (1907) 274; Zunz, Soc. Royal des Sciences méd et nat. de Bruxelles (1906) und (1907); Bulletins Bd. 64 und Annales Bd. 16; Autoref. im Biochem. Zentralbl. 5 (1906) 184, 599, 6 (1907) 2154; Pozerski, Soc. Biol. 70 (1911) 21.

²⁾ Morawitz, loc. cit. Fußnote 3, S. 291.

³⁾ Fuld, loc. cit. Fußnote 4, S. 291.

kinase und Kalziumsalzen entsteht, kann man die zugrunde liegenden Tatsachen auch dahin formulieren, daß die Wirkung, als deren Träger das Fibrinferment betrachtet wird, an die drei genannten Faktoren gebunden ist. Denn wesentlich mehr als eben diese Wirkung ist beim Fibrinferment, wie bei allen anderen enzymatischen Substanzen, tatsächlich nicht bekannt.

Dies zeigt auch die Diskussion über seine chemische Natur, welche die heterogensten Meinungsäußerungen zutage gefördert hat. Denn wie beim Pepsin der von Pikelharing¹⁾ sowie Nencki und Nadina Sieber²⁾ dem vermuteten „Riesenmolekül“ zugeschriebene Charakter eines Nukleoproteids³⁾ aufs schärfste mit den Angaben von Sundberg⁴⁾ und Schrumpf⁵⁾ über eiweißfreies Pepsin⁶⁾ kontrastiert⁷⁾, so stehen auch beim Fibrinferment der Ansicht von Wright⁸⁾, Pikelharing⁹⁾, Huiskamp¹⁰⁾, Foà¹¹⁾, Herlitzka und Borrino¹²⁾, nach welchen das Ferment als Nukleoprotein oder dessen Kalziumsalz anzusprechen wäre, andere Anschauungen gegenüber, so diejenige von Howell (loc. cit.), der das Thrombin als Protein, die

¹⁾ Pikelharing, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22 (1896) 233, 35 (1902) 8.

²⁾ Nencki u. Sieber, Zeitschr. f. physiol. Chem. 33 (1901) 291; Arch. Sciences Biol. Petersburg 9 (1902) 47. Diese Angaben beziehen sich auf das von Schoumow-Simanowski, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 33 (1894) 336, durch Abkühlen von Magensaft auf 0° erhaltene „körnige Pepsin“.

³⁾ Siehe auch Friedenthal, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1900) 181; Friedenthal u. Miyamota, Zentralbl. f. Physiol. 15 (1901) 785.

⁴⁾ Sundberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 9 (1885) 319.

⁵⁾ Schrumpf, Hofmeisters Beitr. 6 (1905) 396.

⁶⁾ Nicht günstig ist dieser Annahme das auf einen sehr komplizierten Bau deutende, vollkommen fehlende Diffusionsvermögen des Pepsins durch Pergamentpapier [Hammarsten, Malys Jahrbuch 3 (1874) 160; Wolffhügel, Pflügers Archiv 7 (1873) 188]. Durch Papier de la Rue vermag dagegen Pepsin zu passieren, wie Fermi u. Pernossi, Zeitschr. f. Hygiene 18 (1894) 111, gezeigt haben.

⁷⁾ Ueber die in gewisser Beziehung ähnlichen Streitfragen über die chemische Natur des Trypsins siehe Vernon, Journ. Physiol. 27 (1901) 288, 28 (1902) 448, 29 (1903) 302; Leveux, Amer. Journ. Physiol. 5 (1901) 298; Mays, Zeitschr. f. physiol. Chem. 38 (1903) 428.

⁸⁾ Wright, Lancet 1 (1892) 457.

⁹⁾ Pikelharing, Verhandl. Akad. Amsterdam 1 (1892); Zentralbl. f. Physiol. 9 (1895) Nr. 3; Biochem. Zeitschr. 11 (1908) 1; Pikelharing u. Huiskamp, Zeitschr. f. physiol. Chem. 39 (1903) 22.

¹⁰⁾ Huiskamp, Zeitschr. f. physiol. Chem. 34 (1901) 32.

¹¹⁾ Foà u. Levi, Lo sperim. 59 (1905); zitiert nach Morawitz, Blutgerinnung, in Oppenheimers Handb. d. Biochem., Jena [2] 2 (1908) 40.

¹²⁾ Herlitzka u. Borrino, Arch. ital. Biol. 39 (1903) 1

thromboplastische Substanz als Lipoid betrachtet¹⁾. Eine Beziehung zu den Lipoiden scheint bei der Gerinnung offenbar vorhanden zu sein, da Zak²⁾ gezeigt hat, daß die Herabsetzung der Lipoiden des Plasmas aus irgend einem Grund (fermentative Lipoidsplaltung, Fällung der Lipoiden durch Alkaloide, wie Chinin, Kokain, Strychnin) die Gerinnung verzögert oder völlig hemmt, während Vermehrung der in Petroläther löslichen lipoidartigen Plasmastoffe selbst oder Zusatz von Hirnphosphatiden den gegenteiligen Effekt besitzt. Vielleicht hängt auch die gewöhnlich auf eine Antikinese zurückgeführte Gerinnungshinderung, welche das Kobralysin von den intravaskuläre Gerinnungen hervorruhenden Viperidengiften unterscheidet³⁾, damit zusammen, daß das Kobralysin gerinnungsbeschleunigendes Lezithin zu binden vermag⁴⁾.

Was die Funktion der Kalziumsalze betrifft, so kann sie vielleicht einfach als eine Beeinflussung des kolloiden Zustandes des Substrates oder der auf das letztere eingestellten enzymatischen Agenzien betrachtet werden. Man müßte dann eine Aktivierung auch durch andere hierzu geeignete Ionen und Kolloide erwarten. Mit Rücksicht auf die Analogie im Mechanismus der Aktivierung ist es von Interesse, daß bei der Trypsinaktivierung in der Tat Kolloide eine Rolle spielen können, wie Larguier des Bancel⁵⁾ insbesondere für die kolloiden Farbstoffe Toluidinblau, Magdalarot und — wenn auch schwächer — für Methylviolett und Kongorot nachweisen konnte. Das Thrombogen und die von Pekelharing⁶⁾ allerdings bestrittene Thrombokinese hätten sich gegenüber den erwähnten Einflüssen anderer Art gemeinsam in die eigentlich fermentative Funktion zu teilen.

Die Prüfung auf fertiges Fibrinferment, Thrombogen und Thrombokinese sowie Fibrinogen.

Auch der Analytiker hat mit dem komplexen Charakter des Fibrinfermentes selbst zu rechnen. Bewirkt der Zusatz eines zu prüfen-

¹⁾ Siehe Halliburton u. Friend, Journ. Physiol. 10 (1887) 532; Halliburton u. Brodie, Ebenda 17 (1894) 135; Hammarsten, Ergebnisse d. Physiol. [1] 1 (1902) 330; siehe ferner den Befund von Morawitz, Archiv f. klin. Medizin 79 (1904) 1, daß eine Beziehung zwischen Wirkungsgrad und Nukleoproteidgehalt nicht besteht.

²⁾ Zak, Archiv f. experim. Pathol. 70 (1912) 27.

³⁾ Mellanby, Journ. Physiol. 38 (1903) 28, 441.

⁴⁾ Siehe über das Kobralezithid: *Allg. Teil*, S. 534, 535.

⁵⁾ Larguier des Bancel, Soc. Biol. 59 (1905) 130.

⁶⁾ Pekelharing, Biochem. Zeitschr. 11 (1908) 1.

den Materials Gerinnung, so darf daraus noch nicht auf die Gegenwart von fertigem Thrombin in jenem Material geschlossen werden. Es braucht nur die eine Komponente, z. B. die Kinase, zu fehlen, und ihr Zusatz ist dann das gerinnungsauslösende Moment.

Dies muß berücksichtigt werden, wenn es sich um den Nachweis von Fibrinferment in fibrinogenfreien Flüssigkeiten handelt und das Fibrinogen als Reagens hinzugesetzt wird. Häufig verwendet man nämlich an Stelle einer reinen, nach den Angaben von Hammarsten¹⁾ oder Nolf²⁾ durch Halbsättigung von Pferdeplasma mit Kochsalz und gründlicher Reinigung des ausgefallten Fibrinogens gewonnenen Fibrinogenlösung normale oder pathologische tierische Flüssigkeiten, die Fibrinogen, nicht aber fertiges Fibrinferment enthalten.

So können bisweilen seröse Transsudate Verwendung finden. Ferner gelingt es, aus Blut ein Fibrinogenreagens herzustellen, und zwar empfiehlt sich sehr die Methode von Arthus³⁾, welcher Hundeblut mit 3%oigem Fluornatrium versetzt und das abzentrifugierte Plasma für den Fermentnachweis verwendet. Man kann auch zu einer bestimmten Menge 2%oiger Fluornatriumlösung direkt die 10fache Menge Blut fließen lassen. Beim Fluoridplasma ist jedoch zu berücksichtigen, daß es nach Rettger⁴⁾ bisweilen durch Kalkzusatz zur Gerinnung gebracht wird. Mit Kalksalzen im Ueberschuß versetztes Fluoridplasma ist nach ihm ein besonders empfehlenswertes Reagens auf Kinase. Statt des Fluoridplasmas kann nach Fuld⁵⁾ auch Pferdeoxalatplasma oder bei 0° aufgefangenes und von den Blutkörperchen durch Sedimentation befreites Pferdeblut benutzt werden. Delezenne⁶⁾ sowie Bordet und Gengou⁷⁾ bedienen sich des in völlig sauberen, staubgeschützten Gefäßen, unter Vermeidung einer Berührung mit Gewebesaft aufgefangenen, von den Blutkörperchen durch rasches Zentrifugieren befreiten Vogelblutplasmas.

Kaninchenblut gerinnt nach derselben Methode behandelt nur dann nicht, wenn es in paraffinierten Gefäßen aufgefangen wird. Die geringste Berührung mit der katalytisch wirksamen Glaswand bedingt dagegen augenblickliche Gerinnung. Auch für die Gewinnung von nicht gerinnendem Plasma aus Fischblut

¹⁾ Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22 (1896/97) 332.

²⁾ Nolf, Arch. internat. Physiol. 6 (1908) 3.

³⁾ Arthus u. Paget, Arch. Physiol. 22 (1890) 739; Arthus, Soc. Biol. 53 (1901) 962; Journ. Physiol. Pathol. 3 (1901) 887.

⁴⁾ Rettger, Amer. Journ. Physiol. 23 (1909) 340, 24 (1909) 406.

⁵⁾ Fuld, Hofmeisters Beitr. 2 (1902) 514.

⁶⁾ Delezenne, Soc. Biol. 48 (1896) 782; Arch. Physiol. 9 (1897) 333.

⁷⁾ Bordet u. Gengou, Ann. Inst. Pasteur 15 (1901) 129.

und aus Blut von wirbellosen Tieren¹⁾ (Hummer) empfiehlt es sich nach Nolf²⁾, die zur Aufnahme des Plasmas bestimmten Gefäße und alle mit dem Blute in Berührung kommenden Instrumente zu paraffinieren.

Die meisten der im vorigen angegebenen Herstellungsverfahren für das Fibrinogenreagens liefern nun aber Präparate, die lediglich Reagenzien auf die Kinase darstellen und nicht auf fertiges Fibrinferment. Zur Prüfung auf dieses letztere ist von Bordet und Gengou³⁾ durch Zusatz von 1 Teil gesättigter Magnesiumsulfatlösung⁴⁾ oder 20%iger Kochsalzlösung auf 3 Teile Blut ungerinnbar gemachtes und auf das 20fache verdünntes Kaninchenplasma empfohlen worden.

Als Fibrinogenreagens zum Nachweis von fertigem Fibrinferment ist dann vor allem auch das 2‰ Natriumoxalat oder 4‰ Natriumzitrat enthaltende, direkt durch Einfließen des Blutes aus der Ader in die entsprechende Menge einer Natriumoxalat- oder Natriumzitratlösung⁵⁾ und Abzentrifugieren der Blutkörperchen gewonnene Plasma geeignet⁶⁾, da in solchem Plasma infolge der Ausschaltung der Kalksalze die Fermentbildung ausbleibt⁷⁾.

Häufig kommen das Ferment und sein Substrat in irgend einem Körpersaft gemeinsam vor, und da nun, wie erwähnt wurde, das Fibrinogen dadurch gekennzeichnet ist, daß es bei Gegenwart von Fibrinferment spontan gerinnt, so lassen sich beide Stoffe an dieser Reaktion erkennen, so z. B. ist Fibrinferment immer im Harn vorhanden und verrät sich selbst, zugleich mit einem bei stärkeren Blutbeimischungen vorkommenden Fibrinogengehalt, durch die Ausscheidung von Blutgerinnseln von der charakteristischen mikroskopisch nachweisbaren Faserstruktur und dem Quellungsvermögen in verdünnter

¹⁾ Einer anderen Methodik bedient sich L. Loeb, Hofmeisters Beitr. 5 (1904) 192, 6 (1905) 260.

²⁾ Nolf, Arch. internat. Physiol. 4 (1906) 216.

³⁾ Bordet u. Gengou, Ann. Inst. Pasteur 17 (1903) 822.

⁴⁾ A. Schmidt (Mühlheim), Archiv f. Anat. u. Physiol. (physiol. Abteil.) 33 (1880), der in derselben Weise durch Auffangen des Blutes in 28%iger Magnesiumsulfatlösung, Schütteln und Abzentrifugieren ein klares Plasma herstellte, trocknet dasselbe rasch über konzentrierter Schwefelsäure und pulverisiert den sehr lange wirksamen Rückstand.

⁵⁾ Auf 1 ccm 2%ige Natriumoxalatlösung oder 1 ccm 4%ige Natriumzitratlösung 9 ccm Blut.

⁶⁾ Siehe auch im vorigen.

⁷⁾ Ueber das von Nolf als Reagens auf seine thromboplastische Substanz empfohlene Peptonplasma siehe z. B. Fano, Dubois-Reymonds Archiv f. Physiol. (1881) 269; Delezenne, Arch. Physiol. 9 (1897) 646. Ueber Hirudinplasma siehe Dickinson, Journ. Physiol. 11 (1890) 566.

Essigsäure beim Stehen des Harns. Bei der tropischen Chylurie und in vereinzelt Fällen von Nephritis gerinnt der Harn auch ohne Blutbeimischung von selbst.

Zur quantitativen Bestimmung des Fibrinfermentes hat Wohlgemuth¹⁾ empfohlen, eine Anzahl Reagenzgläschen mit von 1 ccm absteigenden Mengen des auf Fibrinferment zu prüfenden Materials (z. B. Serum) zu beschicken und das in jedem Gläschen an 1 ccm fehlende Volumen mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9—1 %ig) zu ergänzen. Jedes Gläschen erhält dann einen Zusatz von 2 ccm aufs 10fache verdünnter Fibrinogenlösung (in Form von Magnesiumsulfatplasma)²⁾, wird durchgeschüttelt und kommt auf 24 Stunden in den Eisschrank. Danach wird durch vorsichtiges Neigen der Gläschen dasjenige herausgesucht, in welchem die vorhandene Fibrinfermentmenge gerade groß genug ist, um ein noch deutlich sichtbares Gerinnsel zu erzeugen. Die in dem betreffenden Gläschen enthaltene Menge des Untersuchungsmaterials in 1 dividiert, ergibt dann die Anzahl der in 1 ccm enthaltenen Fibrinfermenteinheiten. Für normales Menschenserum wurden von Wohlgemuth auf diesem Wege 62,5—250 solcher Einheiten erhalten, für Kaninchenserum 31,5—125 und für Hundeserum 125—250.

Der Versuch kann auch umgekehrt zur Ermittlung des Fibrinogens dienen, wenn man nach Wohlgemuth (loc. cit.) von 1 ccm absteigende Mengen Fibrinogen in eine Anzahl Reagenzgläser bringt, zu den mit physiologischer Kochsalzlösung zu 1 ccm ergänzten Gläscheninhalten je 1 ccm 5fach verdünntes Serum als Fibrinferment führendes Reagens hinzufügt und gleich wie vorhin angegeben die weitere Behandlung und Berechnung ausführt.

Auch kann das Fibrinogen durch Essigsäurefällung³⁾ oder durch Fällung mit Natriumsulfat⁴⁾ oder neutraler Ammoniumsulfatlösung⁵⁾ ermittelt werden.

Die Versuchsanordnung von Wohlgemuth ist auch ohne weiteres für die Ermittlung des Thrombogens zu verwenden, wenn man zu jedem Gläschen einen Zusatz von z. B. 1 ccm Thrombokinaselösung hinzufügt und außerdem eine Kontrollserie ansetzt, die

¹⁾ Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 27 (1910) 79.

²⁾ Siehe im vorigen.

³⁾ Doyon, Morel u. Péju. Soc. Biol. 58 (1905) 657.

⁴⁾ Porges u. Spiro, Hofmeisters Beitr. 3 (1902) 277.

⁵⁾ Ueber Nachweis und Bedeutung des Fibrinogens, Inaug.-Dissert. von Reye, Straßburg 1908.

an Stelle der letzteren dieselbe Menge physiologischer Kochsalzlösung enthält. Die Thrombokinase ¹⁾ wird am besten nach dem Vorschlag Batellis ²⁾ hergestellt ³⁾ durch Zerreiben von Pferde- oder Schaf- lunge mit 2 Volumen Wasser, Kolieren der kurze Zeit sich selbst überlassenen Masse, Zusatz von Essigsäure zum Filtrat bis zur Konzen- tration von 1,5 ‰, Abzentrifugieren des Niederschlags, Neutralisation mit Sodalösung, geringem Alkoholzusatz und Trocknen des blaßgrauen Niederschlags im Vakuum über Schwefelsäure bei 34°.

Die Gerinnungszeit. Als weiteres komplizierendes Moment spielen in den verwickelten Vorgang der Blutgerinnung die noch ein- gehender gewürdigten hemmenden Mechanismen hinein.

So erscheint die bei klinischen Blutuntersuchungen häufig zu ermittelnde Gerinnungszeit, welche bei verschiedenen Krankheiten eine Veränderung erleidet, als Resultierende der gerinnungsbeschleunigen- den wie der verzögernden Ursachen.

Mit Rücksicht auf die schon erwähnten Einwände, die gegen die fermentative Natur des Vorganges der Blutgerinnung erhoben worden sind, sei aus der großen Zahl dieser dem Analytiker fernerstehenden Verfahren hier nur die folgende von Vierordt ⁴⁾ angegebene Me- thode herausgegriffen und für die übrigen auf die Originalliteratur ver- wiesen ⁵⁾.

Nach dieser ältesten durchaus nicht einwandfreien Methode saugt man den der Fingerkuppe entnommenen Blutropfen bis zur Höhe von $\frac{1}{2}$ cm in eine Glaskapillare von ungefähr 5 cm Länge und 1 mm innerem Durchmesser auf und führt durch dieselbe von der anderen Seite der Ka- pillare ein gut gereinigtes, durch Kochen mit Alkohol und Aether entfet-

¹⁾ Ueber die Darstellung des Thromboplastins siehe Howell, Cecil, Amer. Journ. Physiol. 26, 453, 29 (1910) 156.

²⁾ Batelli, Soc. Biol. 68 (1910) 789.

³⁾ Ueber weitere zur Darstellung der Thrombokinase empfohlene Methoden siehe Morawitz, loc. cit. Fußnote 3. S. 291.

⁴⁾ Vierordt, Archiv f. Heilkunde 19 (1878) 193. Ueber eine Modifikation dieser Methode siehe Kottmann u. Lidsky, Zeitschr. f. klin. Medizin 69 (1910) 431, 71 (1910) 346.

⁵⁾ Wright, Lancet (1892), 1, 457; Brodie u. Russel, Journ. Physiol. 21 (1897) 403; Milian, Soc. méd. des hôpitaux de Paris (1901); Hinman u. Sladen, John Hopkins Hosp. Bull. 18 (1907) (modifizierte Miliansche Me- thode); Sabrazès, Fol. haematol. 3 (1906) 432; Bürker, Archiv f. d. ges. Physiol. 118 (1907) 452; Buckmaster, Zentralbl. f. Physiol. (1907); Morawitz u. Bierich, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 56 (1907) 115; W. Schultz, Berliner klin. Wochenschr. (1910) 527; Kottmann, Zeitschr. f. klin. Medizin 69 (1910) 415; Fuld u. Schlesinger, Berliner klin. Wochenschr. (1912) Nr. 28.

tetes, wenigstens 10 cm langes weißes Pferdehaar, das nur an der mit dem Blut nicht in Berührung kommenden Seite mit den Fingern angefaßt werden darf, dann schiebt man das Pferdehaar jede Minute um einen halben Zentimeter weiter aus der Kapillare heraus. Sobald die Gerinnung beginnt, beobachtet man eine rötliche Verfärbung des Pferdehaares. Mit völlig beendigter Gerinnung erscheint es jedoch wieder farblos oder die ganze Blutmasse haftet dem Haar als festes Gerinnsel an.

Beziehungen zwischen Fibrinferment und anderen Proteasen.

Schon das im vorigen Abschnitt erwähnte Zusammenwirken von Thrombogen und Thrombokinase legt es nahe, an die Zweiteilung des lytischen Immunkörpers in Ambozeptor und Komplement zu denken. Dieser Analogieschluß ist auch von Nolf¹⁾ gezogen worden, welcher die Vorstellung entwickelt hat, daß sich das Thrombogen, ursprünglich von ihm Hepatothrombin genannt, mit dem der Thrombokinase entsprechenden Thrombozym (Leukothrombin), welches von den Leukozyten und Endothelzellen abgesondert wird, nach Art der Ambozeptor-Komplement-Bindung mit dem Substrat, dem Fibrinogen, verankert und dasselbe hierauf verdaut²⁾. Geradeso wie bei diesem Verdauungsvorgang ist nun aber auch die Eiweißverdauung durch Trypsin an die Gegenwart einer zweiten, von Pawlow als Enterokinase, von Hamburger und Hekma³⁾ als Zymolysin bezeichneten Substanz gebunden⁴⁾. Es ist dies ein wahrscheinlich relativ thermosta-

¹⁾ Nolf, Arch. int. Physiol. 3 (1905) 1, 4 (1906) 165, 6 (1908) 1, 115, 306.

²⁾ Zugleich betrachtet aber Nolf den Gerinnungsvorgang selbst als einen gegenseitigen Ausflockungsprozeß der drei Kolloide: Fibrinogen, Thrombogen und Thrombozym, ähnlich wie schon Woldridge, Die Gerinnung des Blutes, Leipzig 1891, die Gerinnung als eine kolloide Fällung zwischen einem Fibrinogen A und einem Fibrinogen B betrachtete.

³⁾ Hamburger u. Hekma, Journ. Physiol. Pathol. 4 (1902) 805; Hekma, Ebenda 6 (1904) 25; Archiv f. Anat. u. Physiol. (1904) 343.

⁴⁾ Schepowalnikow, Die Physiologie des Darmsaftes, Dissert., Petersburg 1899 (Pawlows Laboratorium); Savitsch, Soc. des méd. russes St. Pétersbourg (1900/01); Vernon, Journ. Physiol. 28 (1902) 375; Delezenne, Soc. Biol. 54 (1902) 693; Delezenne u. Frouin. Ebenda 54 (1902) 691; Compt. rend. 134 (1902) 1526; Glaeßner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 40 (1903) 465; Kadjikoff, 9. Pirogoff-Kongreß, 1904; Biochem. Zentralbl. 3 (1904) 847; Ellinger u. Cohn, Zeitschr. f. physiol. Chem. 45 (1905) 28; Hamill, Journ. Physiol. 33 (1906) 476; Camus u. Gley, Journ. Physiol. Pathol. 6 (1907) 987; Welsch, Arch. int. Physiol. 7 (1909) 247; Mellanby u. Woolley, Journ. Physiol. 45 (1912) 370.

biles¹⁾, giftiges²⁾ Agens im Darmsaft, von welchem angenommen wurde, daß es den Leukozyten³⁾, speziell den Eosinophilen⁴⁾ entstamme. Nach den Untersuchungen von Stassano und Billon⁵⁾, Heckma (loc. cit.), Bayliss und Starling (loc. cit.) sowie Camus und Gley (loc. cit.) soll jedoch die Enterokinase aus dem Darmepithel hervorgehen. Delezenne zeigte, daß die Enterokinase vermöge ihrer Fähigkeit, sich quantitativ an Fibrin zu binden, einer Flüssigkeit durch Schütteln mit wenigen Fibrinflocken entzogen werden kann.

Ob die Kinase den Charakter eines Fermentes besitzt, darüber wird noch zur Stunde gestritten.

Für die schon von Pawlow angenommene Fermentnatur der Enterokinase sind Delezenne⁶⁾ sowie Bayliss und Starling⁷⁾ eingetreten, während Hamburger und Hekma⁸⁾ hiergegen die Aktivierung des Trypsins durch Enterokinase nach stöchiometrischen Gesetzen und Cohnheim⁹⁾ die Hemmung der Trypsinwirkung durch einen Ueberschuß von Enterokinase und die Löslichkeit in 90%igem Alkohol ins Feld führen.

All dies dürfte nur ein Streit um des Kaisers Bart sein; denn noch deutlicher als bei der weniger genau erforschten Fibringerinnung tritt hier der Vergleich mit dem gegen jedes artfremde Eiweiß gerichteten lytischen Immunkörper zutage. Hier wie dort ist die fermentative Spaltung an das Zusammenwirken zweier Komponenten, Ambozeptor und Komplement, gebunden, und die Frage würde sich dahin zuspitzen: Ist man berechtigt, dem Träger einer Teilfunktion der fermentativen Wirksamkeit selbst die Natur eines Fermentes zuzuschreiben? Dies setzt zunächst eine Entscheidung über diese Teilfunktion selbst voraus. Die Teilfunktion der Enterokinase und wohl auch der Thrombokinese scheint nun in ihrem Bindungsvermögen, einerseits gegenüber dem Substrat, anderseits gegenüber der anderen Komponente, dem Protrypsin (resp. dem Thrombogen), zu bestehen. Während sich bei Ab-

¹⁾ Larguier des Bancel, Soc. Biol. 54 (1902) 651; Bierry u. Henri, Ebenda 54 (1902) 667; siehe demgegenüber die Angaben von Delezenne in seinen verschiedenen, ebenda in den Bänden 53 (1901) und 54 (1902) erschienenen Arbeiten sowie Hamburger u. Hekma, Journ. Physiol. Pathol. 4 (1902) 805, welche eine Zerstörbarkeit durch Erhitzen annehmen.

²⁾ Delezenne, Soc. Biol. 54 (1902) 281, 283, 590, 693, 56 (1904) 166.

³⁾ Simon u. Stassano, Soc. Biol. 55 (1903) 1501.

⁴⁾ Lombroso, Reale Accad. di Med. di Torino, Sed. 20. März 1903.

⁵⁾ Stassano u. Billon, Soc. Biol. 54 (1902) 623.

⁶⁾ Delezenne, Loc. cit. Fußnote 2, diese Seite.

⁷⁾ Bayliss u. Starling, Journ. Physiol. 30 (1904) 61, 32 (1906) 129.

⁸⁾ Hamburger u. Hekma, Loc. cit. Fußnote 3, vorige Seite.

⁹⁾ Cohnheim, Arch. Science Biol., Suppl. 11 (1904) 112.

wesenheit oder unzureichender Menge von Substrat die Bindung zwischen den beiden fermentativen Komponenten in einer Zerstörung des Protrypsins durch die Enterokinase äußert¹⁾, verdankt unter normalen Bedingungen das Ferment diesem Umstand seine Fähigkeit, sich mit dem Substrat zu verankern und dasselbe damit der Spaltung zugänglich zu machen.

In der Kinase liegt das Werkzeug vor, welches ein und denselben Fermentkomplex zur feinsten Anpassung an das Substrat befähigen kann. Durch die Ausbildung dieses Werkzeugs unter dem Reiz eines Substrates vermag aus einem unspezifischen, ubiquitären eiweißspaltenden Enzym ein mehr oder weniger streng spezifisches zu werden.

Daß der Enterokinase eine solche Vermittlerrolle zukommt, dafür spricht der Befund von Delezenne²⁾, daß rote Blutkörperchen nur dann von Pankreassaft gelöst werden, wenn man sie zuvor mit Enterokinase behandelt, während bei einer Behandlung in der umgekehrten Reihenfolge keine Einwirkung stattfindet. Delezenne hat, gestützt auf diesen Befund, auch nicht gezauert, die Enterokinase als Ambozeptor zu betrachten. Das thermolabile Komplement wäre demgegenüber der uneingestellte, eigentliche tryptische Komplex, das Ferment im engeren Sinn, welches nach seiner Verankerung den Zerfall des Substrates bedingt. Bei unserer absoluten Unkenntnis über den Mechanismus dieses Hauptprozesses, der sich unter dem Einfluß des Enzyms vollzieht, läßt sich jedoch nicht entscheiden, ob sich der spezifische Faktor auf diese ausschließlich vermittelnde Funktion eines Hilfsstoffes beschränkt oder ob er am Spaltprozesse selbst Anteil nimmt. Solange wir aber hierüber nicht orientiert sind, ist die ganze Frage, ob in der Kinase ein Ferment vorliegt oder nicht, eine müßige. Nur so viel ist sicher, daß die Kinase für sich allein nur eine Bindung, nicht aber eine Spaltung des Substrates bewirkt. Sie besitzt demnach die charakteristische Eigentümlichkeit der Zymoide oder Fermentoide. Es sind dies Stoffe, welche man durch Erhitzen aktiver Fermentlösungen (Pepsin, Lab, Amylase, Emulsin) auf ungefähr 60° erhält, die also der thermolabilen, im engeren Sinne fermentativen Komponente, des Komplements, beraubt sind und nach verschiedenen Forschern³⁾ durch Substratentziehung Hemmungswirkungen auf aktive Fermente ausüben sollen.

¹⁾ Siehe Dastre u. Stassano, Loc. cit.; Dieselben, Arch. int. Physiol. 1 (1904) 86; Cohnheim, loc. cit. vorige Fußnote.

²⁾ Delezenne. Soc. Biol. 55 (1903) 171.

³⁾ Korschun, Zeitschr. f. physiol. Chem. 36 (1902) 141, 37 (1903) 366; Bearn u. Cramer, Biochem. Journ. 2 (1907) 174; siehe ferner Schwarz, Hof-

Merkwürdig ist eine Hemmungswirkung auf solcher Basis allerdings; sollte man doch als Folge dieser Bindung erwarten, daß bei Zusatz von normalem, aktivem Enzym dessen thermolabiler Faktor geradeso in Reaktion mit dem schon veränderten Substrat treten würde, wie wenn dasselbe mit den beiden Komponenten gleichzeitig in Berührung gebracht wird. Vielleicht liegt eher eine Zerstörung des Enzyms durch den überschüssigen Ambozeptor vor.

Daß wir es bei der Fermentoidbildung mit nichts anderem als einer Komplementzerstörung zu tun haben, scheint mir daraus hervorzugehen, daß Walker¹⁾ durch Erhitzen auf 55° inaktiviertes Lab sowie Amylase durch Blut und Gewebeextrakte zu reaktivieren vermochte.

Die Analogien zwischen Fibrinferment und Trypsin, welche im vorigen besprochen worden sind, müssen nun offenbar dazu führen, nach Beziehungen zwischen der enzymatischen Blutgerinnung und den im Blut selbst vorhandenen Proteasen zu suchen. Eine solche Beziehung hat zuerst Nolf²⁾ vermutet, indem er die Thrombokinese mit der Leukoprotease, dem totes Eiweiß spaltenden Absonderungsprodukt der Leukozyten, identifizieren wollte. Nur einen Spezialfall dieser Wirkung stellt die Fibrinolyse dar, deren Zusammenhang mit der Leukoprotease der im Fibrin eingeschlossenen Leukozyten³⁾ früher schon erwähnt wurde. Andererseits liegt es auf der Hand, die Thrombokinese mit der Trypsin aktivierenden Kinase, welche Delezenne und Pozerski⁴⁾ sowie Zunz⁵⁾ im Blutserum auffanden, in Zusammenhang zu bringen. Hierbei kann die Kinase entweder erst aus den zerfallenden Formelementen hervorgehen oder (falls sie schon im strömenden Blute vorhanden ist) durch eine Antikinese an der Aktivierung des Thrombogens verhindert werden. Auch die Möglichkeit liegt vor, daß sich zwar Thrombin bildet, daß dieses aber durch einen Hemmungsstoff an der Entfaltung seiner Wirkung gehindert wird. In der Tat sind Hemmungsstoffe (Antikinasen) wie normal vorhandene und immunisatorisch erzeugte Antithrombine im Serum von Blaizot⁶⁾, im

meisters Beitr. 6 (1905) 524; vgl. jedoch Seligmann, Med. Klinik (1906) 359. Ueber das entgegengesetzte Verhalten, also raschere Zerstörung des bindenden Agens bei der Schüttelinaktivierung des Pepsins, siehe Minami, Biochem. Zeitschrift 39 (1912) 75.

¹⁾ Walker, Journ. Physiol. 33 (1906) 21.

²⁾ Nolf, loc. cit. Fußnote 4, S. 293 u. Fußnote 1, S. 304.

³⁾ Rulot, Arch. int. Physiol. 1 (1903) 152.

⁴⁾ Delezenne u. Pozerski, Soc. Biol. 55 (1903) 693.

⁵⁾ Zunz, loc. cit. Fußnote 1, S. 297 u. Fußnote 7, S. 308.

⁶⁾ Blaizot, Soc. Biol. 70 (1911) 560.

Plasma von Muraschew (Gänseplasma)¹⁾ sowie von Nolf²⁾ und Doyon³⁾ festgestellt worden. Ihre Identifizierung mit von Delezenne⁴⁾, Bayliss und Starling (loc. cit.) im normalen sowie im Immunserum angenommenen Hemmungstoffen gegen Trypsin aktivierende Kinase liegt nahe.

Zu berücksichtigen ist jedoch die noch durchaus problematische Natur dieser Hemmungstoffe. Während nämlich Dastre und Stassano⁵⁾ sowie Delezenne⁶⁾ einen gegen die Kinase gerichteten Hemmungstoff⁷⁾ annehmen, treten Cathcart⁸⁾ und Hamill⁹⁾ für ein eigentliches Antitrypsin ein. Nach Ascoli und Bezzola¹⁰⁾ soll das im Blutserum enthaltene Antitrypsin gegen beide Bestandteile (Komplement und Ambozeptor) gerichtet sein, eine Annahme, die mit der Vorstellung übereinstimmt, daß die Antikörper nicht gegen die wirksamen Stoffe selbst, sondern nur gegen deren Einfluß gerichtet sind.

Derselbe Parallelismus zwischen Trypsinogen- und Thrombogenaktivierung zeigt sich auch bei dem sonstigen Vorkommen von Kinasen, so in Schlangengiften¹¹⁾ und in Bakterien¹²⁾. An Milch wurde ebenfalls eine Aktivierung gegenüber dem Trypsinogen wie dem Thrombogen festgestellt. Jedoch kann hier auch die eine Wirkung fehlen oder sich der Beobachtung entziehen. Z. B. konnten Moro und Hamburger¹³⁾, im Gegensatz zum Verhalten von Menschenmilch,

¹⁾ Muraschew, Archiv f. klin. Medizin 80 (1904) 187.

²⁾ Nolf, Arch. internat. Physiol. 3 (1905) 1, 4 (1906) 165, 6 (1908) 1, 115, 306, 7 (1909) 289, 379, 422; Ergebn. d. inneren Medizin (1913); Arch. Fisiol, 7 (1909).

³⁾ Doyon, Journ. Physiol. Pathol. gén. 14 (1912) 229; Doyon, Morel u. Policard, Compt. rend. 152 (1911) 147, 793, und sonstige Arbeiten von Doyon in den Soc. Biol. von 1904—12.

⁴⁾ Delezenne, Soc. Biol. 55 (1903) 132.

⁵⁾ Dastre u. Stassano, Soc. Biol. 55 (1903) 130, 254.

⁶⁾ Delezenne, Soc. Biol. 55 (1903) 132.

⁷⁾ Siehe über Antikinasen auch Bayliss u. Starling, Journ. Physiol. 30 (1904) 61, 32 (1906) 129; Delezenne u. Pozerski, Soc. Biol. 55 (1903) 935; Zunz, Bull. de l'acad. Royale de Belgique [4] 19 (1905) 729; Autoref. im Biochem. Zentralbl. 5 (1906) 185; Hensel, Sitzung der Volksgesundheitsges. Petersburg; Biochem. Zentralbl. 1 (1902) 817, 864.

⁸⁾ Cathcart, Journ. Physiol. 31 (1905) 497.

⁹⁾ Hamill, Journ. Physiol. 33 (1906) 479.

¹⁰⁾ Ascoli u. Bezzola, Zentralbl. f. Bakteriologie. 33 (1903) 783.

¹¹⁾ Ueber Thrombokinasen in Schlangengiften siehe Mellanby, Journ. Physiol. 38 (1908) 28, 441.

¹²⁾ Ueber Thrombokinasen in Bakterien siehe Much, Biochem. Zeitschr. 14 (1908) 143. Ueber Bakterienenterokinase siehe Delezenne, Soc. Biol. 54 (1902); Breton, Ebenda 56 (1904) 35.

¹³⁾ Moro u. Hamburger, Wiener klin. Wochenschr. (1902) 121.

mit Kuhmilch keine Fibrinogengerinnung (an Hydrozeleflüssigkeit) hervorrufen, während Hougardy¹⁾ durch Kuhmilch Trypsinogen aktivieren konnte. In anderen Fällen ist überhaupt nur auf die eine Wirkung geprüft worden, so bei den Giftpilzen auf Enterokinase durch Delezenne und Mouton²⁾. Der Parallelismus im Vorkommen müßte sich auch bei den Antikörpern verfolgen lassen, wenn diesem Punkte Beachtung geschenkt würde.

Außer dem bei der proteolytischen wie bei der blutgerinnenden Wirkung festgestellten und schon eingehend besprochenen hemmenden Einfluß durch die Spaltprodukte, besonders Albumosen und Peptone, liegen für Askarisextrakte Angaben vor über hemmende Wirkung, sowohl gegenüber der Blutgerinnung³⁾ wie gegenüber der eiweißspaltenden Wirkung des Trypsins⁴⁾.

Das die Blutgerinnung hemmende Hirudin⁵⁾ einerseits, das die tryptische Auflösung koagulierten Eiereiweißes hemmende Prinzip des rohen Eiereiweißes⁶⁾ andererseits wären ebenfalls geeignete Objekte zur Untersuchung dieser interessanten Frage.

Die erwähnte Ansicht von Nolf ist nun allerdings nicht ohne weiteres mit unseren vorigen Ausführungen über die Rolle der Kinasen in Einklang zu bringen. Es braucht dies jedoch nicht in Widerspruch zu stehen mit der Tatsache, daß die Thrombokinese des Blutes den Leukozyten und Blutplättchen entstammt und daß auch manches dafür spricht, daß das Thrombogen diesen Ursprung besitzt⁷⁾, denn die Leukozyten sind außerdem die Quelle einer gegen lebende Bakterien gerichteten proteolytischen Substanz, auf deren Gegenwart zum Teil die bakteriziden Eigenschaften des Plasmas beruhen. Man könnte daher an eine Identifizierung der Thrombase mit diesen leukozytären Bakteriozidinen⁸⁾

¹⁾ Hougardy, Bull. de l'acad. Royal de Belgique (1906) 888; Arch. internat. Physiol. 3 (1905); Biochem. Zentralbl. 6, 533, 668.

²⁾ Delezenne u. Mouton, Soc. Biol. 55 (1903) 27.

³⁾ Emile-Weil u. Boye, Soc. Biol. 69, 284.

⁴⁾ Dastre u. Stassano, Arch. internat. Physiol. 1 (1904) 86.

⁵⁾ Franz, Archiv f. experim. Pathol. 49 (1903) 342; Cowie, Journ. med. Research 24 (1911) 496.

⁶⁾ Delezenne u. Pozerski, Soc. Biol. 55 (1903) 935.

⁷⁾ Siehe über diesen Punkt Rüchel u. Spitta, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 49 (1903) 285; Pratt, Ebenda 49 (1903) 299; Schittenhelm u. Bodong, Ebenda 54 (1905) 217; Fry, Fol. Haematol. 8 (1908) Heft 6; Bürker, Münchener med. Wochenschr. 55 (1908) 550; le Sourd u. Pagniez, Journ. Physiol. (1909) 1.

⁸⁾ Siehe über Bakteriozidine Much, Immunitätswiss., Würzburg 1911, S. 56 ff.

denken ¹⁾. Gegen eine Identifizierung mit den Faktoren, die uns bisher als Beschleuniger des Gerinnungsprozesses begegnet sind, spricht aber die Tatsache, daß die leukozytären Bakteriozidine in Uebereinstimmung damit, daß sie unspezifisch sind, einheitlich wirken, also nicht in eine Ambozeptor- und eine Komplementkomponente zerfallen.

Dagegen würde dieses Verhalten im Einklang stehen mit demjenigen einer anderen Gruppe von blutgerinnenden Stoffen, welche Loeb ²⁾ in den Geweben, namentlich der Wirbellosen, aufgefunden hat. Diese von Loeb als Koaguline bezeichneten Stoffe ³⁾ bedürfen zur Entfaltung ihrer Wirksamkeit nur der Gegenwart von Kalziumsalzen. Gegenüber dem gerinnungshemmenden Einfluß von Fluornatrium sind die Koaguline empfindlicher als gewöhnliches Fibrinferment, da schon durch geringe Mengen die Koagulation von zellfreiem Plasma in Gegenwart eines Stückchens Gewebe oder Gewebepreßsaft gehemmt wird ⁴⁾. Die Koaguline sollen auch einem anderen Zeitgesetz folgen; doch ist die nicht ganz gleichartige Arbeitsweise zu berücksichtigen, da Fuld ⁵⁾ das Zeitgesetz der Thrombase in derselben Weise — natürlich unter Ersatz der Milch durch Plasma — (je 2 ccm) wie beim Lab ermittelt hat, während Loeb ⁶⁾ je 3 ccm Hummerplasma in drei mit 1 ccm, 0,5 ccm und 0,25 ccm Muskelextrakt beschickte Petrischalen hinzugab und die Zeit bis zum Auftreten eines dünnen Fibrinbelags ermittelte. Im übrigen sind auch die für die Thrombase von verschiedener Seite erhaltenen Resultate nicht übereinstimmend. Foa ⁷⁾ fand ein dem

¹⁾ Vgl. die Ansicht von de Waele, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 16 (1913) 311, über eine Beziehung zur Anaphylaxie.

²⁾ Loeb, Hofmeisters Beitr. 5 (1904) 534, 8 (1906) 67; Biochem. Zentralbl. 6 (1907); Biochem. Zeitschr. 24 (1910) 479; Deetjen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63 (1909) 1; Vinci u. Chistoni, Arch. ital. Biol. 53 (1910) 206; Argand u. Billard, Soc. Biol. 1 (1911) 5873; Bordet u. Delange, Bull. Acad. méd. Belgique 25 (1911) 568; Bull. Soc. Sciences méd. et nat. de Bruxelles 69 (1911) 3; Bayne-Jones, Amer. Journ. Physiol. 30 (1912) 74; Cramer u. Pringle, Journ. Physiol. 45 (1912) Heft 3, S. XI; Quart. Journ. Physiol. 6 (1913) 1.

³⁾ Vgl. auch Delezenne, Arch. Physiol. (1897) 333; Conradi, Hofmeisters Beitr. 1 (1902) 136; Arthus, Journ. Physiol. 4 (1902), zitiert nach Oppenheimer, Fermente, Bd. 2, Leipzig 1913, S. 638; Hewlett, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 49 (1903) 307.

⁴⁾ Ueber die von Loeb aufgefundenene, wohl durch die spezifische Einstellung der proteolytisch wirkenden Thrombase auf das arteigene Fibrinogen bedingte Eigentümlichkeit, daß Blut mit Gewebe der eigenen Art rascher koaguliert als mit artfremdem, siehe den *Allg. Teil* S. 546.

⁵⁾ Fuld, Hofmeisters Beitr. 2 (1902) 514.

⁶⁾ Loeb, Hofmeisters Beitr. 9 (1907) 185.

⁷⁾ Foa, Arch. Fisiol. 10 (1912) 479.

Zeitgesetz der Labung innerhalb gewisser Grenzen entsprechendes Verhalten, während Fuld (loc. cit.), Madsen und Walbum¹⁾ das Produkt $f \cdot t^{2/3}$ für konstant ansprechen, worin f die Fermentkonzentration und t die Reaktionszeit bedeutet. Erwähnt sei ferner, daß Landsberg²⁾ zwei oder sogar mehrere Simultanreaktionen annimmt. Der chemischen Hauptreaktion zwischen Fibrinogen und Thrombase entgegen wirkt eine physikalische Nebenreaktion, die zur Hemmung des Einflusses der Thrombase durch deren Adsorption an Serumproteine führt.

Auch für die gewöhnlichen Gerinnungsstoffe existieren im Blut durch die Verdauung von Kasein, Gelatine³⁾ sowie koaguliertem Serum⁴⁾ und Milchthymolagarplatten⁵⁾ nachweisbare proteolytische Enzyme⁶⁾, die sich mit denselben zur Deckung bringen lassen. Es sind die in jedem Serum vorhandenen humoralen Bakteriozidine, Stoffe unbekannter Provenienz, die Ambozeptor und Komplement aufweisen und hierdurch die Möglichkeit besitzen, sich unter dem Einfluß eines bestimmten Erregers auf diesen spezifisch einzustellen.

Im Gegensatz zu den leukozytären Bakteriozidinen, welche erst bei 65° zugrunde gehen, verlieren die humoralen schon bei 57° ihr Komplement und damit ihre Wirkung, geradeso wie bei der nämlichen Temperatur (56—58°) das Fibrinferment eine Inaktivierung erfährt. Ferner ist nicht einzusehen, warum ein Unterschied bestehen sollte zwischen den soeben besprochenen humoralen Bakteriozidinen von dem Moment an, wo sie sich spezifisch auf irgendein artfremdes, geformtes oder ungeformtes⁷⁾ Eiweiß eingestellt haben, und dem lytischen Immunkörper, den wir im Anschluß an die labende Wirkung proteolytischer Enzyme — in diesem Fall speziell der Enzyme des Blutes — besprochen haben und auf den wir im nachfolgenden Abschnitt noch zurückkommen werden. Auch hier wird das Komplement durch Erhitzen auf 56° zerstört und erst ein Zusatz von frischem Serum gibt dem-

¹⁾ Madsen u. Walbum siehe Arrhenius, Immunochemie, 1907.

²⁾ Landsberg, Biochem. Zeitschr. 50 (1913) 245.

³⁾ Delezenne u. Pozerski, Soc. Biol. 55 (1903) 327, 690.

⁴⁾ Zunz, Bull. de l'acad. méd. Belgique (1905).

⁵⁾ Fresemann, Fol. microbiol. 1 (1912) Heft 3; Biochem. Zentralbl. 13, 2112.

⁶⁾ Siehe über das Vorkommen dieser Proteasen bei Säugetieren und Vögeln Ehrenreich, Beitr. zur Kenntnis der Fermente und Antifermente des Blutes, Inaug. Dissert., Würzburg 1904.

⁷⁾ Michaelis u. Oppenheimer, Archiv f. Anat. u. Physiol., Suppl. (1902) 336; Hofmeisters Beitr. 4 (1903) 263; Heßlner, Zeitschr. f. Biol. 50 (1908) 25; Münchener med. Wochenschr. 55 (1908) 2521.

selben die bakterizide Fähigkeit zurück. Die noch nicht spezifisch eingestellten humoralen Bakteriozidine würden dagegen der normalen Blutprotease mit noch unspezifischem Ambozeptor entsprechen, die, je nachdem dieselbe bei der Beobachtung auf Fibrinogen, auf Kasein oder auf in die Blutbahn gelangtes artfremdes, geformtes oder ungeformtes Eiweiß ihre verdauende Wirkung ausübt, als Fibrinferment, als normales Labenzym des Serums¹⁾, als bakterizides oder proteolytisches Prinzip in die Erscheinung tritt.

Vielleicht läßt sich der Einfluß gegenüber dem Fibrinogen auch der Wirkung gegenüber artfremdem Eiweiß subsumieren, da mit dem Verlassen der Blutbahn Veränderungen an diesem labilen Eiweißkörper vor sich gehen, die demselben den Stempel der Artfremdheit aufdrücken. Auch kann man an Unterschiede denken, ähnlich jenen die zwischen lebendem und totem Eiweiß bestehen. Hand in Hand mit dieser Veränderung wird aber das Fibrinogen der verdauenden Wirkung der Blutprotease (Fibrinferment) zugänglich, und es kommt zu der die Gerinnung bedingenden Aufspaltung. In der Blutbahn würde dagegen, trotz der Gegenwart von Komplement (Thrombogen) und Ambozeptor (Thrombokinese) das Fibrinogen nicht angegriffen. Wenn Bernabei²⁾ den aktiven Sauerstoff des strömenden Blutes als eine wesentliche Ursache der Hemmung der Blutgerinnung anspricht, so berührt er damit die schon erwähnte Auffassung, daß der Gehalt an Sauerstoff und dessen besondere peroxydische Bindung den Hauptanteil am Zustandekommen der Resistenzunterschiede z. B. zwischen lebendem und totem Eiweiß bildet. Die Blutgerinnung wäre dann aufzufassen als eine Art Autolyse des mit dem Verlassen der Blutbahn sich verändernden Fibrinogens. Denn diese Veränderungen könnten gewissermaßen den Absterbeerscheinungen an die Seite gestellt werden.

Entspricht jene Auffassung den Tatsachen, so nimmt das Fibrinogen im Blut keine Ausnahmestellung ein. Auch die roten Blutkörperchen, für welche Mathes³⁾ im Gegensatz zum Verhalten der Leukozyten⁴⁾ gegenüber Trypsin, während ihres Lebens keinen tryptischen Angriff nachweisen konnte⁵⁾, werden mit dem Absterben zugänglich für proteolytische Einflüsse. Die Resistenz der lebendigen Substanz ist ja auch allgemein eine so weitgehende, daß Protozoen, Bakterien⁶⁾, Wür-

¹⁾ Bang, Hofmeisters Beitr. 5 (1904) 395.

²⁾ Bernabei, Arch. Fisiol. 8, 458.

³⁾ Mathes, Münchener med. Wochenschr. (1902) 8.

⁴⁾ Magi, Arch. Farmacol. (1908); Biochem. Zentralbl. 8 (1907) 1247.

⁵⁾ Nach Delezenne, Soc. Biol. 55 (1903) 171.

⁶⁾ Vgl. im vorigen, S. 162. Siehe auch über Resistenz, insbesondere der gram-

mer, Frösche¹⁾ sowie pflanzliche Materien, vor allem Pilze, nach Fermi²⁾ sogar in Proteaselösungen gezüchtet werden können.

Hemmungstoffe der Proteolyse.

Zu der soeben erwähnten allgemeinen Resistenz des lebenden Gewebes proteolytischen Einflüssen gegenüber kommt nun noch eine besonders gesteigerte Resistenz bei denjenigen Geweben hinzu, die normalerweise mit proteolytischen Enzymen in Berührung stehen. So verfallen z. B. Jejunum und Milz nach der Implantation in die Magenwand der Verdauung³⁾, während nach Rosenbach (loc. cit.) normales Pankreas, welches in das Duodenum implantiert wurde, der Verdauung entgeht. Stark aktives Trypsin kann allerdings auch diese Hemmungen überwinden. So verfällt nicht nur das umliegende Gewebe einer meist zum Tode führenden Nekrose⁴⁾, wenn Pankreassekret der körpereigenen oder einer körperfremden Drüse in aktiviertem Zustand in die Bauchhöhle gelangt⁵⁾ oder wenn aktiver Fistelsaft injiziert wird, son-

positiven lebenden Bakterien, Weinkopf, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 11 (1912) 1; Kantorowicz, Münchener med. Wochenschr. 56 (1909) 897, 1419.

¹⁾ Siehe auch die von Kirchheim, Archiv f. experim. Pathol. 66 (1911) 352, 71 (1912) 1, angegebene, von Rosenbach, Archiv f. klin. Chirurgie 93 (1910) 279, 94 (1911) 403, bestrittene Resistenz des Froschbeins.

²⁾ Fermi, Arch. Farmacol. 8 (1909) 481, 10, 449; Biochem. Zentralbl. 10 (1907/08) 1067, 13 (1908) 369; Zentralbl. f. Bakteriologie 56 (1910) 55.

³⁾ Siehe Kathe, Berliner klin. Wochenschr. 45 (1908) 2135; Katzenstein, Ebenda 45 (1908) 1749; Wullstein, Kongreß der deutschen Zentr. f. Chirurgie (1906) XXXV, und die gegenteilige Angabe von Neumann, Zentralbl. f. allg. Pathol. 18 (1907) 1; siehe ferner Derselbe, Virchows Archiv 184 (1906) 360.

⁴⁾ Wie Battelli u. Lina Stern, Biochem. Zeitschr. 34 (1911) 263, an mit Trypsin behandeltem Gewebestreifen zeigten, wird dabei auch die Hauptatmung der Zellen schwer betroffen.

⁵⁾ E. v. Bergmann u. Angerer, Festschr. zum 500jährigen Bestehen der Universität Würzburg, 1882, S. 137; Achalmé, Ann. Inst. Pasteur 15 (1901) 737; G. v. Bergmann, Zeitschr. f. experim. Pathol. 3 (1906) 401; Doberauer, Beitr. z. klin. Chirurgie 48 (1906) 456; Guleke, Archiv f. klin. Chirurgie 85 (1908) 644; G. v. Bergmann u. Guleke, Münchener med. Wochenschr. 57 (1910) 1673; Bamberg, Zeitschr. f. experim. Pathol. 5 (1909) 742; Lattes, Arch. Farmacol. 13, 37; Biochem. Zentralbl. 14 (1912) 402; siehe ferner Loeper u. Esmonet, Soc. Biol. 65 (1908) 996; v. Fürth u. Schwarz, Biochem. Zeitschrift 20 (1909) 384; Brugnattelli, Bull. Soc. Med. Chirurg. Pavia (1909); Biochem. Zentralbl. 10, 1989; Heß, Mitteil. aus dem Grenzgebiet der Medizin und Chirurgie 19 (1909) 637; Visentini, Virchows Archiv 195 (1909) 555; Fischler, Archiv f. klin. Medizin 100, 329, 103 (1911) 156.

dern die Pankreasdrüse selbst wird durch Injektion von stark aktivem Pankreasfistelsaft oder Pankreasextraktpräparaten nekrotisiert ¹⁾. Daß die Pankreasdrüse nach diesen Versuchen eine geringere Widerstandsfähigkeit zu besitzen scheint als Magen und Darm, für welche das Ausbleiben einer Selbstverdauung durch die Erfahrung genügend erwiesen ist, rührt zweifellos daher, daß das Drüsengewebe selbst normalerweise nur mit dem inoffensiven Trypsinzymogen in Berührung kommt. Wo das Trypsinogen z. B. durch aus dem Darm in die Pankreasdrüse einwandernde Bakterien, schon in der Drüse aktiviert wird, kann es daher auch zu ihrer mit den erwähnten nekrotischen Erscheinungen einhergehenden Selbstverdauung kommen.

Theoretisches über die Hemmungstoffe der Proteasewirkungen. Was die Ursache der Resistenz von Geweben gegen ihre eigenen Proteasen anbetrifft, so scheinen verschiedene Faktoren in Betracht zu kommen. Entgegen der Ansicht von Klug ²⁾, der einen schützenden Ueberzug von proteaseresistentem Schleim ³⁾ für das Ausbleiben der Selbstverdauung des Magendarmkanals verantwortlich macht, käme es nach den Untersuchungen von Licini ⁴⁾ bei der Einwirkung der Verdauungssäfte auf lebendes Gewebe zunächst zu einer Mazeration der ganzen Oberflächenschicht desselben. Im Verlauf der hierdurch hervorgerufenen Entzündung würde eine Scheidewand aus später von Epithel überwachsenem Bindegewebe ausgebildet, welche das darunterliegende Organgewebe vor der Einwirkung der Verdauungssäfte schützt.

Neben diesem mechanischen Schutz der Gewebe des Verdauungstraktus gegen die Wirkung der Verdauungssäfte ist vor allem der Hemmungskörper zu gedenken, antitryptischer Stoffe z. B., wie sie Weinland ⁵⁾ in den gegen die Verdauungssäfte geschützten parasitischen Eingeweidewürmern nachgewiesen, und die er, ebenso wie Fiori ⁶⁾, Marie ⁷⁾ und Katzenstein ⁸⁾ auch für das Ausbleiben einer Selbstverdauung von Magen und Darm verantwortlich gemacht

¹⁾ Polya, Archiv f. d. ges. Physiol. **121** (1906) 61; Mittel. aus dem Grenzgebiet der Medizin und Chirurgie **24** (1911) 1.

²⁾ Klug, Arch. int. Physiol. **5** (1907) 297.

³⁾ Siehe auch Roux u. Riva, Soc. Biol. **60** (1906) 537; Dezani, Reale Accad. delle Scienze Torino, Februar 1911; Biochem. Zentralbl. **12**, 3051.

⁴⁾ Licini, Beitr. z. klin. Chirurgie **82** (1912) 377.

⁵⁾ Weinland, Zeitschr. f. Biol. **43** (1902) 86, **44** (1902) 1. 46.

⁶⁾ Fiori, Mittel. aus dem Grenzgebiet der Medizin und Chirurgie **26** (1912) 289.

⁷⁾ Marie, De l'antitrypsine. Recherches expérimentales sur la résistance des tissus vivants à la digestion peptique. Thèse de Paris, Nr. 155.

⁸⁾ Katzenstein, Archiv f. klin. Chirurgie **100** (1913) 939, 101, 1.

hat. Zwischen dieser Auffassung der antiproteolytischen Wirkungen und der besprochenen Auffassung von Licini braucht kein Gegensatz zu bestehen, da die Ausbildung der schützenden Scheidewand als Folge einer resynthetisierenden (plasteinogenen) Wirkung der bei der Mazeration gebildeten Eiweißspaltprodukte betrachtet werden kann, abgesehen von dem die weitere Spaltung nach dem Massenwirkungsgesetz hemmenden Einfluß der Eiweißspaltprodukte.

Nicht anders würden die Verhältnisse in den Geweben der übrigen Organe liegen, so daß es auch dort zur Ausbildung der von Chiarolanza¹⁾ fast in sämtlichen Organen gefundenen Antitrypsine gegen die eigenen Gewebsproteasen (eventuell auch Blutproteasen), die sonst Autolyse herbeiführen würden, kommt.

Vor allem enthält das Blutserum eine gegen die Leukoprotease, wie gegen den Geweben entstammende Proteasen²⁾ und die denselben nahestehende Hefetryptase³⁾ gerichtete antiproteolytische Substanz, welche nach Jochmann⁴⁾ mit dem vorerwähnten Antitrypsin sowohl in bezug auf seine Wirkung wie in bezug auf die meisten seiner sonstigen Eigenschaften identifiziert werden dürfte. Auch soll nach Landsteiner⁵⁾, Hedin⁶⁾, Opie und Barker⁷⁾, Müller⁸⁾ sowie Kämmerer und Mogulesko⁹⁾ Träger der antifermentativen Eigenschaften in beiden Fällen das Serumalbumin sein (während bei der Antiprotease der Bakterien die antifermentative Wirkung an der Globulinfraktion haften würde).

¹⁾ Chiarolanza, Med. naturwissensch. Archiv 2 (1909) 1, Biochem. Zentralbl. 9, 914.

²⁾ Baer u. Loeb, Archiv f. experim. Pathol. 53 (1905) 1, 56 (1906) 68.

³⁾ Siehe über die Antiprotease der Hefezellen und deren Verwandtschaft mit dem Antitrypsin Buchner u. Haehn, Biochem. Zeitschr. 26 (1910) 171; Kämmerer u. Mogulesko, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 12 (1911) 16.

⁴⁾ Jochmann u. Müller, Münchener med. Wochenschr. 53 (1906) 1507, 2002; Jochmann u. Ziegler, Deutsche med. Wochenschr. 33 (1907) 749; Jochmann u. Lockemann, Hofmeisters Beitr. 11 (1908) 450; Jochmann u. Kantorowicz, Münchener med. Wochenschr. (1908) 728; Zeitschr. f. klin. Medizin 66 (1908) 153; Jochmann, Zeitschr. f. Hygiene 61 (1908) 71; Virchows Archiv 194 (1908) 352.

⁵⁾ Landsteiner, Zentralbl. f. Bakteriologie 27 (1900) 357.

⁶⁾ Hedin, Journ. Physiol. 32 (1905) 390; Biochem. Journ. 1 (1906) 474, 484, 2 (1907) 81; Zeitschr. f. physiol. Chem. 50 (1907) 497, 52 (1907) 412.

⁷⁾ Opie u. Barker, Journ. experim. Med. 9 (1907) 207; Archiv f. klin. Medizin 92 (1908) 199.

⁸⁾ Müller, Archiv f. klin. Medizin 92 (1908) 199.

⁹⁾ Kämmerer u. Mogulesko, Zeitschr. f. Immunitätsforschung u. experim. Therap., I. Teil 12 (1911) 16.

Allerdings spricht gegen eine direkte Identifizierung die nicht übereinstimmende Koagulationstemperatur, da Stern und Eppenstein¹⁾ für die Antileukoprotease eine Zerstörung bei 58° gegenüber 64° beim Antitrypsin fanden. Die erstere könnte vielleicht einem Antikörper gegen die leukozytären, die letztere einem solchen gegen die humoralen Bakteriozidine entsprechen.

Wie dem auch sei, eine Verminderung der antienzymatischen Stoffe im Blut soll neben der Verminderung jener Stoffe in den betroffenen Geweben²⁾, die für das Ausbleiben der Verdauung der verschiedenen Organe während des Lebens die Verantwortung tragen, nach Fiori³⁾ eine Ursache des Ulcus pepticum sein. Auf eine Beziehung solcher Störungen zur antiproteolytischen, speziell zur Antipepsinwirkung des Blutes weisen die starken Schwankungen hin, welche Lieblein⁴⁾ in Fällen von Ulcus ventriculi gefunden hat.

Ebenso finden sich im Blut gerinnungshemmende Stoffe, welche normalerweise den Einfluß des Fibrinferments kompensieren. Es besteht allem Anschein nach ein Gleichgewicht zwischen den gerinnungsbeschleunigenden und den gerinnungshemmenden Faktoren, das erst mit dem Verlassen der Blutbahn eine Störung erleidet.

Die Ursachen einer Hemmung der Blutgerinnung⁵⁾ wie der anderen Wirkungen der Protease können verschiedenartige sein: Bindung der Kinase, Zerstörung des Komplementes, Ablenkung des Fermentes durch Stoffe, die eine größere Affinität zu demselben besitzen als das zu spaltende Substrat⁶⁾ usw., vor allem aber die Hemmung, welche die Spaltprodukte selbst, auch die Produkte autolytischer Spal-

¹⁾ Stern u. Eppenstein, Schlesische Ges. f. vaterländ. Kultur, 1906, Autoref. im Biochem. Zentralbl. 5 (1906) 1359.

²⁾ Siehe die Arbeit von Katzenstein, Ueber die experimentelle Hervorbringung des Magengeschwürs, Archiv f. klin. Chirurgie 100 (1913) 939, 101, 1; siehe auch Fiori, loc. cit. folgende Fußnote; Licini, loc. cit. Fußnote 4, S. 314; Marie, De l'antipepsine, Recherches expér. sur la résistance des tissus vivants à la digest. peptique, Thèse de Paris, Nr. 155.

³⁾ Fiori, Mitteil. a. d. Grenzgeb. d. Medizin u. Chirurgie 26 (1912) 239.

⁴⁾ Lieblein, Mitteil. a. d. Grenzgeb. d. Medizin u. Chirurgie 25 (1912) 391.

⁵⁾ Sabbatani, Arch. ital. Biol. 31 (1899) 37. Siehe über Hemmungstoffe: Conradi, Hofmeisters Beitr. 1 (1902) 136; Bordet u. Gengou, Ann. Inst. Pasteur 15 (1901) 129; siehe auch Ebenda 18 (1904) 26; Morawitz, Hofmeisters Beitr. 4 (1903) 381, 5 (1904) 171; Archiv f. klin. Medizin 79 (1904) 1, 80 (1904) 340; Loeb u. Smith, Zentralbl. f. Bakteriologie 37 (1904) 93; Loeb, Hofmeisters Beitr. 5 (1904) 191, 534; Doyon, Soc. Biol. 56 (1904) 192, 421; Loeb u. Fleisher, Journ. of infect. diseases 7 (1910) Heft 5; Biochem. Zentralbl. 11 (1910) 1713; Muraschew, Archiv f. klin. Medizin 80 (1904) 187; F. Franz, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 49 (1902/03) 342; Fuld u. Spiro, Hofmeisters Beitr. 5 (1904) 171; Noc, Ann. Inst. Pasteur 18 (1904) 387; Martin, Journ. Physiol. 32 (1905) 207.

⁶⁾ Hedin, loc. cit. Fußnote 6, vorige Seite, hat eine derartige Inaktivierung für das Serumalbumin auch gegenüber dem Trypsin wahrscheinlich gemacht.

tung¹⁾, gegenüber dem Fibrinferment²⁾ auszuüben vermögen und deren Wirkung wir z. B. am Fibringlobulin und deren Gegenstück, der Molkenalbumose, schon näher ins Auge gefaßt haben. Daß das Fibringlobulin (welches vielleicht dem von Bordet und Gengou³⁾ durch Immunisierung erhaltenen Antifibrinferment entsprechen könnte) nicht allein als Hemmungsstoff für die Blutgerinnung fungiert, sondern auf die Protease selbst eine Wirkung ausübt, dafür könnte der Umstand angeführt werden, daß das Antitrypsin, welches zuerst Achalme⁴⁾, ferner Joseph und Pringsheim⁵⁾ durch Injektion von Pankreatin bzw. Trypsin, später v. Bergmann und Bamberg⁶⁾ durch Implantation von Pankreas in die Bauchhöhle, sowie Isaja⁷⁾, Braunstein und Kepinow⁸⁾ durch Implantation von Tumorgewebe und durch Leberbrei erhielten, nach verschiedenen Angaben dieselbe Denaturierungstemperatur, ca. 64°, besitzt wie das Fibringlobulin.

Bei den abweichenden Angaben, wie denjenigen von Döblin⁹⁾ und Hamill¹⁰⁾, die das Antitrypsin für kochbeständig halten, mag es sich um einen vom Antitrypsin verschiedenen Hemmungsstoff gehandelt haben. So haben O. Schwarz¹¹⁾ und J. Bauer¹²⁾ Lipotide, bei welchen sie Hemmungswirkungen gegenüber Tryptasen feststellen konnten, als Antitrypsin angesprochen¹³⁾; doch könnte es sich gerade in diesem Fall um eine „Komplementablenkung“ handeln. Die Heterogenität der antitryptisch wirkenden Substanzen ist auch die Ursache der divergierenden Angaben über die Löslichkeitsverhältnisse, die

¹⁾ Siehe über Autolyse den betreffenden Abschnitt S. 238 ff.

²⁾ Doyon u. Dubrulle und Doyon u. Sarvonat, *Compt. rend. Soc. Biol.* **73** (1912) 546; Doyon u. Dubrulle, *Ebenda* **73** (1912) 285; Doyon, Dubrulle u. Sarvonat, *Ebenda* **73** (1912) 720.

³⁾ Bordet u. Gengou, *Ann. Inst. Pasteur* **18** (1904) 26.

⁴⁾ Achalme, *Ann. Inst. Pasteur* **15** (1901) 737.

⁵⁾ Joseph u. Pringsheim, *ref. im Archiv f. Verdauungskrankh.* (1913).

⁶⁾ v. Bergmann u. Bamberg, *Berliner klin. Wochenschr.* **45** (1908) 1396; v. Bergmann, *Med. Klinik* (1909) 50.

⁷⁾ Isaja, *Tumori* **1**, 87; *Biochem. Zentralbl.* **13**, 2424.

⁸⁾ Braunstein u. Kepinow, *Biochem. Zeitschr.* **27** (1910) 170.

⁹⁾ Döblin, *Zeitschr. f. Immunitätsforschung* **4** (1909) 229.

¹⁰⁾ Hamill, *Journ. Physiol.* **33** (1906) 479, behauptete Kochbeständigkeit nur für saure Lösungen.

¹¹⁾ O. Schwarz, *Wiener klin. Wochenschr.* (1909) 1151.

¹²⁾ J. Bauer, *Zeitschr. f. Immunitätsforschung* **5** (1910) 186.

¹³⁾ s. K. Meyer, *Berliner klin. Wochenschr.* **46** (1909) 1890.

Dialysierbarkeit und andere Eigenschaften des Antitrypsins¹⁾, wie auch des Antipepsins²⁾.

Die Hemmungskörper des normalen Serums³⁾ lassen sich wohl zum Teil als Eiweißspaltprodukte auffassen. Denn die Hemmung der proteolytischen Eiweißverdauung durch die Verdauungsprodukte selbst ist nicht nur eine schon ausreichend gewürdigte, allgemein bekannte Erscheinung⁴⁾, sondern sie wird auch durch Befunde von Glaeßner (l. c.), Rosenthal⁵⁾, Remedi und Bolognesi⁶⁾ direkt gestützt. Danach nimmt die antitryptische Wirkung des Serums bei der Verdauung zu und umgekehrt im Hunger ab. Als Spaltprodukte, die auch Rosenthal für die hemmende Wirkung verantwortlich macht, dürften insbesondere hochmolekulare Albumosen in Frage kommen. Denn nach den Untersuchungen von Lombroso⁷⁾ ist auf eine relativ schwach hemmende bzw. verzögernde Wirkung der entstandenen Aminosäuren zu schließen und damit auf eine geringe Beeinflussung der letzten Abbauphase.

Die normale Antitryptase zeigt keinerlei Anpassung an ein bestimmtes Ferment. Wie Mesnil⁸⁾ fand, ist Schafserum infolgedessen imstande, selbst die so fern als möglich stehende Aktinienprotease zu hemmen. Die normale Antiprotease steht damit im Gegensatz zu den durch Immunisierung gewonnenen Antiproteasen der Bakterien⁹⁾ und zu den Antifermenten des Trypsins, welche den spezifischen Spaltungsverlauf zu hemmen vermögen, der bis in alle Details der Einwirkung einer bestimmten Tryptase entspricht.

¹⁾ Siehe hierüber Hamill, loc. cit. Fußnote 10, vorige Seite; Rosenthal, loc. cit. Fußnote 5, diese Seite; Kawashima, Biochem. Zeitschr. **23** (1909) 186; Weinberg u. Rubinstein, Soc. Biol. **72** (1912) 718.

²⁾ Siehe z. B. Schwarz, Hofmeisters Beitr. **6** (1905) 524; Blum u. Fuld, Zeitschr. f. klin. Medizin **58** (1906) 505.

³⁾ Fermi u. Pernossi, Zeitschr. f. Hygiene **18** (1894) 121; Fermi, Zentralbl. f. Bakteriologie **22** (1897) 1, 50 (1909) 225; Camus u. Gley, Soc. Biol. **47** (1897) 825; Pugliese u. Coggi, Malys Jahrb. **27** (1897) 832; Hahn, Berliner klin. Wochenschr. **34** (1897) 499; Landsteiner, Zentralbl. f. Bakteriologie **27** (1900) 357; Charrin u. Levaditi, Soc. Biol. **52** (1900) 83; Glaeßner, Hofmeisters Beitr. **4** (1903) 79; Jacoby, Biochem. Zeitschr. **10** (1908) 232.

⁴⁾ Vgl. auch das letzte Kapitel des *Allg. Teils*.

⁵⁾ Rosenthal, Fol. Serol. **6** (1910) 285.

⁶⁾ Remedi u. Bolognesi, Gaz. int. med. e chirurg. **32** (1911); Arch. ital. Biol. **56**, 187.

⁷⁾ Lombroso, Arch. Fisiol. **10** (1912) 425.

⁸⁾ Mesnil, Ann. Inst. Pasteur **15** (1901) 352.

⁹⁾ v. Dungern, Münchener med. Wochenschr. (1898) 1040, 1157.

So hat Glaeßner¹⁾ festgestellt, daß das immunisatorisch erzeugte Antitrypsin die stärkste Wirkung auf das tier eigene Trypsin besitzt. In ähnlicher Weise wie beim Trypsin haben v. Eisler²⁾ und Landsteiner³⁾ durch Immunisierung von Gänsen⁴⁾ mit Rinderpepsin einen gegen dieses (ev. dessen Eiweiß?), nicht aber gegen Schweinepepsin gerichteten Antikörper erhalten, der nach Rubinstein⁵⁾ von dem entsprechenden Antitrypsin verschieden wäre.

Doch kann auch eine spezifische Antiprotease, unter Umständen eine generelle, wenn auch unvergleichlich viel schwächere Wirkung gegenüber fremden Proteasen ausüben.

Im Zusammenhang damit sei die außerordentlich interessante Beobachtung von Krause und Klug⁶⁾ erwähnt, daß im Antitoxin serum von Pferden ein vollkommener Parallelismus zwischen Antitrypsin und Antitoxin besteht, was sehr zugunsten meiner 1907 geäußerten Ansicht über die Antitoxine und den Mechanismus ihrer Wirkung spricht.

Jedenfalls bietet die Auffassung⁷⁾ der Antitoxine als Verdauungsprodukte toxischer Proteasen im Organismus die einfachste Erklärungsmöglichkeit für den Parallelismus von Antitrypsin und Antitoxin. Wie der Organismus das parasitische Bakterium mittels des lytischen Immunkörpers zu verdauen trachtet, so sucht das Bakterium seinerseits dem Organismus durch proteolytisch oder lipolytisch wirkende Toxine beizukommen. Doch kann das den Körper überschwemmende Toxin in den Fällen, wo sich der Erreger nur an der Eingangspforte festsetzt (Diphtherie, Tetanus), durch die künstliche Zufuhr der unter dem Einfluß des Toxins selbst entstandenen Spaltprodukte in seiner zerstörenden Wirkung gehemmt werden.

Der Antikörper richtet sich naturgemäß auch gegen die Labwirkung der Protease. Hier auf deutet die Angabe von Morgenroth⁸⁾, daß der hemmende Einfluß von Blutserum⁹⁾ auf die Milchgerinnung, welchen Röden¹⁰⁾ und Briot¹¹⁾ festgestellt haben, einem schon in der Norm vorhandenen Antilab zuzuschreiben ist.

¹⁾ Glaeßner, loc. cit. Fußnote 3, vorige Seite.

²⁾ v. Eisler, Ber. d. Wiener Akad. [3] 114 (1905) 119.

³⁾ Landsteiner, Zentralbl. f. Bakteriologie. 38 (1905) 344.

⁴⁾ Auf diesem Wege hatte früher schon H. Sachs, Fortschritte d. Medizin 20 (1902) 425, ein gegen die 20fache Pepsinmenge schützendes Anti-pepsin gewonnen.

⁵⁾ Rubinstein, Soc. Biol. 71 (1911) 116, 72 (1912) 23, 73 (1912) 205.

⁶⁾ Krause u. Klug, Berliner klin. Wochenschr. 45 (1908) 1454.

⁷⁾ Woker, Probleme der katalytischen Forschung, Leipzig 1907. Siehe auch die Einleitung.

⁸⁾ Morgenroth, Zentralbl. f. Bakteriologie. 27 (1900) 721.

⁹⁾ Namentlich Pferdeserum. Doch auch andere Tiere, wie Fische, Kephelopoden, Krustazeen [Sellier, Soc. Biol. 60 (1906) 316], enthalten Antilab in der Blutflüssigkeit.

¹⁰⁾ Röden, Malys Jahrb. 17 (1887) 160.

¹¹⁾ Briot, Compt. rend. 128 (1899) 1359; Etudes sur la présure, Thèse Paris 1900.

Fuld und Spiro¹⁾ fanden, daß 0,2 ccm normales Pferdeserum hinreichen, um 0,1 ccm ihrer Lablösung zu paralysieren. Durch subkutane Einverleibung von Labferment konnte demgegenüber Morgenroth²⁾, wie erwähnt, ein Immuns-
serum erhalten, welches so stark hemmte, daß die 200fache Labmenge notwendig war, um Gerinnung zu erzeugen, wie ohne die Gegenwart des Hemmungskörpers.

Das durch Immunisierung gewonnene Antilab hat wie andere Stoffe, welche auf diesem Wege entstanden sind, spezifischen Charakter, der sich der besonderen Eigenart des einwirkenden Labenzymz vollkommen anpaßt. Es sei an die schon im vorigen angeführte Tatsache erinnert, daß nicht nur keine Beziehung zwischen tierischem Antilab und der Wirkung der Phytochymasen besteht und umgekehrt³⁾, sondern daß auch zwischen den durch das echte Chymosin des Kälbermagens und den durch das Parachymosin erzeugten Antilaben nicht unerhebliche Differenzen zu bestehen scheinen⁴⁾. Das normale Antilab reagiert demgegenüber wahllos, ja es soll sogar das von Briot⁵⁾ in der Menschenmilch gefundene, auch gegenüber pflanzlichem Lab wirksame Antilab, die stärkste Hemmung auf Rinderlab ausüben.

Neben diesem normalen, unspezifischen oder durch Immunisierung in seiner Wirksamkeit (durch Ausbildung der Spezifität) erhöhten Antilab hat Korschun⁶⁾, — der auch gegen dieses letztere durch Immunisierung von Ziegen einen Gegenkörper, das Anti antilab, zu erzeugen vermochte, — einen ebenfalls im Serum enthaltenen, von ihm Pseudolab genannten, thermostabilen und dialysierbaren Stoff aufgefunden, der das Labferment allmählich zerstört. Ein anderer, von Briot (loc. cit.) und Müller⁷⁾ untersuchter Hemmungskörper wirkt nur der Koagulation des fertig gebildeten Parakaseins entgegen.

Die Auffassung, daß wir es wie bei der Fibrinbildung mit einem ersten Spaltprodukt der verdauenden Wirkung der Blutprotease zu tun haben, steht nicht in Widerspruch mit der Annahme von Gerber⁸⁾, daß nicht einem besonderen Antilab, sondern normalerweise im Blut vorhandenen Eiweißstoffen die hemmende Funktion zuzuschreiben ist. Doch kommt für diese Hemmung auch die von Hedin (loc. cit.) angenommene Fermentablenkung in Betracht, wenigstens wo es sich um die Gegenwirkung von genuinem Eiweiß handelt⁹⁾. Da-

¹⁾ Fuld u. Spiro, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31 (1900) 132.

²⁾ Morgenroth, loc. cit. Fußnote 8, vorige Seite.

³⁾ Morgenroth, loc. cit., und Javillier, Contribution à l'étude de la préure chez les végétaux, Thèse Paris 1903.

⁴⁾ Moro, Zentralbl. f. Bakteriologie. 37 (1904) 485.

⁵⁾ Briot, Compt. rend. 144 (1907) 1164; Journ. Physiol. Pathol. gén. 9 (1907) 784.

⁶⁾ Korschun, Zeitschr. f. physiol. Chem. 36 (1902) 141.

⁷⁾ P. Th. Müller, Zentralbl. f. Bakteriologie. 32 (1902) 521.

⁸⁾ Gerber, siehe dessen zahlreiche Abhandlungen in Soc. Biol. seit 1906.

⁹⁾ Ueber die Hemmung der Tryptasewirkung des Serums durch Eieralbumin usw. siehe Bayliss, Arch. Scienc. Biol., Suppl. 11 (1904), zitiert nach Oppenheimer, Fermente, Spez. Teil, 1909, S. 204; Vernon, Journ. Physiol. 31 (1905) 346.

gegen dürfte der hemmende Einfluß, welchen Albumosen sowohl auf die Blutgerinnung (loc. cit.) wie auf die Milchgerinnung¹⁾ und die gewöhnliche Eiweißlösung (loc. cit.) ausüben, am ehesten mit der Spaltungstheorie in Einklang gebracht werden.

Zweifellos ist bei all diesen Hemmungswirkungen spezifischer und unspezifischer Antiproteasen die Reaktion des Mediums von ausschlaggebender Bedeutung. Aenderungen der Reaktion verschieben das Gleichgewicht zwischen den proteolytischen und antiproteolytischen Einflüssen. So haben Cantacuzène und Jonescu-Mihaiesti²⁾ nur bei neutraler Reaktion eine Hemmung der Pepsinverdauung durch Blutserum nachweisen können. Beim Ansäuern soll die antifermentative Wirkung geschwächt werden, was allerdings Hamburger³⁾ und Oguro⁴⁾ bestritten haben.

Die klinische Bedeutung des Antitrypsinnachweises.

Was die analytische Verwendbarkeit der gegen die Blutprotease-wirkung vorhandenen Antikörper betrifft, so verdient dieselbe nicht gering eingeschätzt zu werden. Für die klinische Analyse hat der Nachweis des Antitrypsins selbst Bedeutung erlangt, seit Brieger und Trebing⁵⁾, v. Bergmann und Meyer⁶⁾ sowie zahlreiche andere Forscher⁷⁾ gezeigt haben, daß bei Karzinom der Antitrypsingehalt des Serums sehr beträchtlich erhöht ist, und umgekehrt vermag nach Roux und Savignac (loc. cit.) ein normaler Antitrypsinwert im Zweifelsfalle eine Krebsdiagnose fast mit Sicherheit auszuschließen.

¹⁾ Gley, Soc. Biol. 48 (1896) 591; Locke, Journ. exp. Med. 2 (1897) 493; Fuld u. Spiro, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31 (1900) 132.

²⁾ Cantacuzène u. Jonescu-Mihaiesti, Soc. Biol. 65 (1908) 273.

³⁾ Hamburger, Journ. of experim. Med. 14 (1912) 535.

⁴⁾ Oguro, Biochem. Zeitschr. 22 (1909) 266.

⁵⁾ Brieger u. Trebing, Berliner klin. Wochenschr. 45 (1908) 1041, 1349 u. 2260.

⁶⁾ v. Bergmann u. K. Meyer, Berliner klin. Wochenschr. 45 (1908) 1673.

⁷⁾ Herzfeld, Berliner klin. Wochenschr. (1908) 2182; Fuld, Ebenda (1908) 1673; Weinberg u. Mello, Soc. Biol. 67 (1909) 441; Eisner, Zeitschrift f. Immunitätsforschung 1 (1909) 650; Roche, Arch. of intern. Med. 3 (1909) 249; Landois, Berliner klin. Wochenschr. 46 (1909) 440; Launoy, Journ. Pharm. Chim. 30 (1909) 393; de Poggenpohl, Arch. de méd. expériment. 21 (1909) 657; Roux u. Savignac, Archive des maladies de l'appareil digestif, August 1912, ref. im Archiv f. Verdauungskrankheiten 19 (1913) 494; G. Weil, Mitteil. a. d. Grenzgeb. d. Medizin u. Chirurgie 29 (1916) 159; R. Weil, Archiv f. intern. Medizin 5 (1910) 109; Pinkuß, Berliner klin. Wochenschr. (1910) 48; Citronblatt, Medizinische Klinik (1912) 1390; E. Freund u. Kaminer, Biochem. Zeitschr. 46 (1912) 470.

Der vermehrte Gehalt des karzinomatösen Organismus an Antitrypsin ist ein zweischneidiges Schwert. Die Ansammlung der unter dem Einfluß der Tumorproteasen erzeugten Verdauungsprodukte wirkt zwar hemmend auf die zerstörende Wirksamkeit dieser proteolytischen Enzyme. Zugleich werden dadurch aber die lytischen Kräfte des Organismus gegenüber den Tumorzellen lahmgelegt, und man geht wohl kaum fehl, wenn man gerade den Antitrypsingehalt für das Unvermögen des Blutes Karzinomatöser, Tumorgewebe zu lösen, verantwortlich macht. Vielleicht sind die durch einen höheren Antitrypsingehalt ausgezeichneten Individuen die für Karzinom disponierten, und eine möglichst frühzeitige Immunisierung mit Antitrypsin nach Korschuns Vorbild¹⁾ wäre am Platz. Nicht unmöglich erscheint es, daß das Fehlschlagen der Immunisierungsversuche gegen Tumoren durch Tumorgewebe beim Menschen, welche Methode Ehrlich bei Mäusen mit so viel Erfolg in Anwendung gebracht hat, ebenfalls mit dem unterschiedlichen Antitrypsingehalt des Blutes bei den beiden Tierarten²⁾ zusammenhängt.

Ein positiver Antitrypsinbefund kann für die Karzinomdiagnose nur als ergänzendes Moment herangezogen werden³⁾, da auch bei anderen schweren Erkrankungen das Serum antitryptische Eigenschaften besitzt⁴⁾.

So zeigten schon Ascoli und Bezzola⁵⁾ bei Pneumonie⁶⁾ ein Ansteigen des Antitrypsingehaltes bis zur Krise, dann einen Abfall, was in irgend einem Zusammenhang zu der kritischen Leukozytenzerstörung in der pneumonischen Lunge⁷⁾, wie mit der von Dick beobachteten Entwicklung proteolytischer Fermente im Blut stehen dürfte. Man könnte um so eher an eine Beziehung zu den Leukozyten denken, als sich Antitrypsin nur im Serum von Tieren findet, die normalerweise Leukoprotease enthalten — ein Umstand, der bei der Ermittlung der Herkunft eines Serums sowie bei entwicklungsgeschichtlichen und

¹⁾ Korschun, loc. cit. Fußnote 6, vorletzte Seite.

²⁾ Das Blut von Mensch, Affe und Hund ist reich an Antitrypsin; außerordentlich wenig findet sich dagegen bei Kaninchen und Meerschweinchen, keines bei Vögeln und Kaltblütern sowie beim Rind [siehe Wiens u. Müller, Zentrabl. f. innere Medizin 28 (1907) 38].

³⁾ Vgl. die Arbeiten von Klieneberger u. Scholz, Archiv f. klin. Medizin 93 (1908) 318; Jochemann, Deutsche med. Wochenschr. 43 (1909) 1872.

⁴⁾ Bei Kindern konnte Pacchione, Riv. di Clin. Pediatr. (1905); Biochem. Zentrabl. 4 (1905) 2103, keine derartige Beeinflussung durch schwere Krankheiten konstatieren.

⁵⁾ Ascoli u. Bezzola, Berliner klin. Wochenschr. 40 (1903) 391.

⁶⁾ Siehe ferner über Antitrypsinvermehrung im Blut bei Pneumonie und anderen akuten Infektionskrankheiten Hort, Brit. Med. Journ. 2 (1909) 2, 967; Wiens, Archiv f. klin. Medizin 96 (1909) 62; Purjesz, Gyogyaszat 50 (1910) 378; Biochem. Zentrabl. 10, 2458; Carpi, Biochimica e Terap. speriment. 1, 403; Biochem. Zentrabl. 10, 578.

⁷⁾ Filehne, Sitzungsber. d. Erlanger phys.-med. Ges., 1877, S. 169; Escherich, Archiv f. klin. Medizin 37 (1885) 196; Bittorf, Ebenda 91 (1907) Nr. 1/2.

pathogenetischen Fragen herangezogen werden kann —, und weil unter pathologischen Verhältnissen das Auftreten des Antikörpers den Leukozyten folgt.

So ist gerade bei leukozytenreichen, ulzerierten Karzinomen das Serum nach Müller und Kolaczek¹⁾ besonders reich an Leukoprotease und deren Antikörper.

Man müßte daher auch bei Leukämie einen stark erhöhten Antitrypsingehalt erwarten. Daß dies nicht in so ausgesprochenem Maße der Fall ist, vielmehr Wiens Schwankungen²⁾ feststellte, könnte vielleicht mit der Degeneration der Leukozyten, welche naturgemäß auf die Proteaseabsonderung zurückwirkt, zusammenhängen. Auch bei Anämien³⁾ sind die Antitrypsinwerte während des Krankheitsverlaufes Schwankungen unterworfen. Die Beeinflussung des Antitrypsingehaltes während des Krankheitsverlaufes dürfte hier mit der Zahl der Erythrozyten und ihrer Beschaffenheit zusammenhängen; denn von Schippers⁴⁾ ist der Nachweis geführt worden, daß auch Erythrozyten Proteasen enthalten. Mit der Verminderung des Erythrozytengehaltes in den Anfangsstadien muß daher zunächst die Proteasebildung aus dieser Quelle und damit auch der Gehalt an durch die Protease erzeugtem Antikörper herabgehen. Mit dem zunehmenden Zerfall der Erythrozyten im Verlauf der Krankheit können aber wiederum Proteasen in vermehrtem Maße frei werden und eine Erhöhung des Antikörpers bedingen.

Daß trotz starker Kachexie der Antitrypsingehalt in den Anfangsstadien der Anämie sinkt, zeigt, daß die Antitrypsinvermehrung nicht ohne weiteres als eine Kachexiereaktion betrachtet werden kann, wie Brieger und Trebing (loc. cit.) angenommen hatten. Wo Kachexie, wie dies häufig der Fall ist, mit Vermehrung des Antitrypsins einhergeht, ist dies wohl als eine Folge der Gewebeseinschmelzung anzusehen, die mit dem Freiwerden hypernormaler Mengen von Gewebeproteasen zu einer gesteigerten Antitrypsinbildung führt. In dem Maß, als bei irgend einer Krankheit Gewebe zerfallen und ihre Proteasen frei werden, in dem Maß muß auch, entsprechend der Auffassung von K. Meyer⁵⁾, der Antitrypsinwert steigen. Ein Gewebe-

¹⁾ Müller u. Kolaczek, Münchener med. Wochenschr. 54 (1907) 354.

²⁾ Siehe über die Beziehungen der Leukozytose zur Antifermentreaktion des Blutes auch Wiens u. Schlecht, Archiv f. klin. Medizin 96 (1909) 44.

³⁾ Klug, Berliner klin. Wochenschr. 46 (1909) 2243; Brenner, Deutsche med. Wochenschr. (1909) 390.

⁴⁾ Schippers, Biochem. Zeitschr. 28 (1910) 418, Dissert., Amsterdam.

⁵⁾ K. Meyer, Berliner klin. Wochenschr. 46 (1909) 1064.

zerfall auf Grund anderer Ursachen, wie intravitale Steigerung der Autolyse¹⁾, Leberveränderungen, die durch Vergiftung mit Phosphor²⁾, Chloroform und Phloridzin hervorgerufen werden³⁾ usw., wirken ebenfalls im Sinne einer Steigerung auf den Antitrypsin-gehalt ein.

Von den nach dieser Richtung hin untersuchten Krankheiten wurde bei Tuberkulose im Blut⁴⁾ und bei Meningitis tuberculosa auch in der Zerebrospinalflüssigkeit⁵⁾, die normalerweise antitrypsinfrei ist⁶⁾, bei Basedow⁷⁾ und bei der gleichsinnig wirkenden Schilddrüsenfütterung (K. Meyer, loc. cit.), sowie bei Rizinvergiftungen⁸⁾ Steigerung des Antitrypsingehaltes festgestellt, während bei Lues die Befunde nicht übereinstimmend sind⁹⁾. Bei Diabetes¹⁰⁾, ausgenommen dem experimentellen Adrenalindiabetes¹¹⁾, sinkt der Antitrypsin-gehalt des Blutes¹²⁾, wie man dies bei denjenigen Fällen, die mit Pankreas-erkrankung einhergehen, infolge mangelnder Tryptasebildung auch erwarten muß.

Theoretisch interessant und praktisch wichtig ist dann vor allem auch die Zunahme des Antitrypsingehaltes im Serum während der Gravi-

¹⁾ Umgekehrt wird die Autolyse durch das Serumantitrypsin gehemmt. Siehe Longcope, Journ. med. Research 13 (1908) 45; Biochem. Zentralbl. 7, 2348.

²⁾ Welsch, Arch. intern. Physiol. 7 (1909) 235, fand jedoch umgekehrt in der normalen Leber Antitrypsin, nicht aber in der Phosphorleber.

³⁾ Braunstein, Arch. intern. Physiol. (1910) 479; Opie, Barker u. Dochez, Journ. experim. Med. 13 (1911) 1.

⁴⁾ Klug, loc. cit.; Wiens, loc. cit.; Hort, loc. cit.; Golla, Lanzet 1 (1909) 1, 969; Waelli, Mitteil. a. d. Grenzgeb. d. Medizin u. Chirurgie 25 (1912) 184.

⁵⁾ Satta u. Gastaldi, Biochim. e Terap. sperim. 2, 49; Biochem. Zentralbl. 11, 675; Corsini, Reale Accad. Fisiocritica 218, 777; Biochem. Zentralbl. 11, 3145.

⁶⁾ Fazio u. Chiarolanza, 23. Adunanza Soc. Ital. Chirurgia, April 1911; Biochem. Zentralbl. 13, 1838. Ueber Antitrypsin in Exsudaten, Ascites, Harn siehe Weinberg u. Laroche, Soc. Biol. 67 (1909) 430; Döblin, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 4 (1909) 224.

⁷⁾ Waelli, loc. cit. Fußnote 4, diese Seite.

⁸⁾ Launoy, Soc. Biol. 70 (1911) 867.

⁹⁾ Fürstenberg u. Trebing, Berliner klin. Wochenschr. 46 (1909) 1357; Kawastina, Zeitschr. f. experim. Pathol. 8 (1911) 653.

¹⁰⁾ Marcus, Zeitschr. f. experim. Pathol. 6 (1909) 879; Neißer u. Koenigsfeld, Zeitschr. f. klin. Medizin 72 (1911) 444; K. Meyer, Biochem. Zeitschrift 40 (1912) 125.

¹¹⁾ K. Meyer, loc. cit. vorige Fußnote.

¹²⁾ Umgekehrt ist auch pankreasvergiftetes Blut von Hédon, Soc. Biol. 74, 238, auf antidiabetische Fähigkeiten geprüft worden.

dität und im Puerperium¹⁾. Man hat diese Zunahme mit einer Resorption von Fermenten aus dem Chorion in Zusammenhang gebracht. Doch möchte ich noch eine andere Auffassung zur Diskussion stellen, die diese Serumreaktion der Gravidität in engsten Zusammenhang zu der im nachfolgenden Abschnitt eingehend besprochenen Serumreaktion der Gravidität von Abderhalden stellt. Hier wie dort wären als Ursache der Reaktion die Abwehrproteasen zu betrachten, welche gegen in die Blutbahn gelangendes Plazentaeiweiß gebildet werden. Während aber bei der Serumreaktion von Abderhalden die unter dem Einfluß der Fermente gebildeten Spaltprodukte von Plazentaeiweiß auf chemischem (Ninhydrinreaktion, Biuretkreaktion) oder auf physikalischem Wege (Polarisation usw.) ermittelt werden, würde es sich bei der hier in Betracht kommenden Serumreaktion um die Feststellung der Hemmung handeln, welche die Abwehrproteasen durch den gegen dieselben genau so wie gegen die Proteasen anderer Provenienz — z. B. Leukoprotease oder Trypsin²⁾ — gebildeten Antikörper³⁾ erfahren. Die Frage, ob die Spaltprodukte selbst als Antikörper fungieren, wie man dies auch nach den Untersuchungen von Rosenthal⁴⁾ annehmen darf, der Antitryptasen als Eiweißspaltprodukte betrachtet, oder ob ein Hemmungsmechanismus auf anderer Grundlage vorliegt, wird dabei nicht berührt.

Die Ermittlung des Antitrypsintiters eines Serums. In irgend einem der angegebenen Fälle, bei denen die Kenntnis des Antitrypsingehaltes des Blutes von Wichtigkeit ist, kann die Ermittlung des Antitrypsintiters des gewonnenen Serums nach einer der folgenden Methoden ausgeführt werden. All diesen ist die Prüfung auf das Ausbleiben der tryptischen Spaltung nach einem der beim Trypsin behandelten Verfahren eigen.

So bedienen sich Achalme und Stévenin⁵⁾ der Prüfung auf das Ausbleiben der Aufhellung von Milch bei der tryptischen Spal-

¹⁾ G. läfenberg, Münchener med. Wochenschr. 56 (1909) 702; G. Becker, Ebenda 56 (1909) 1363; von der Heide u. Krösing, Zeitschr. f. Geburtshilfe u. Gynäkol. 67 (1910) 113; Rosenthal, Zeitschr. f. klin. Medizin 72 (1911) 504.

²⁾ Hinsichtlich des Antikörpers, der im „Antitrypsin“ vorliegt, vgl. auch K. Meyer, Biochem. Zeitschr. 23 (1909) 68 und Cobliner, Ebenda 25 (1910) 494, welche wie bei der Vermischung von Toxin und Antitoxin den Danyszeffekt beobachten konnten. Siehe demgegenüber Kämmerer, Archiv f. klin. Medizin 103 (1911) 341; Kämmerer u. Aubry, Biochem. Zeitschr. 48 (1913) 247.

³⁾ Ueber den Antikörper gegen Pepsin siehe a. a. O. im vorigen.

⁴⁾ Rosenthal, Fol. serol. 6 (1910) 285.

⁵⁾ Achalme u. Stévenin, Soc. Biol. 70 (1911) 333, 480; siehe auch Trebing u. Diesselhorst, Berliner klin. Wochenschr. (1909) 2296.

tung; Mintz¹⁾ beobachtet das Ausbleiben des Abbaus der Serum-eiweißkörper; Barlocco²⁾ stellt ab auf die bei vermehrtem Antitrypsingehalt des Serums erhaltene Koagulierbarkeit desselben trotz Trypsinzusatzes. Es ist diese letztere Methode von Eve³⁾ für den Antitrypsinnachweis in sehr geringen Serummengen ausgearbeitet worden.

Brieger und Trebing⁴⁾ wiederum bedienen sich des Nachweises eines Ausbleibens der Dellenbildung auf einige Tage gelagerten Platten von koagulierte Serum. Sie verfahren dabei in der Weise, daß sie Mischungen von je einer Platinöse des auf seinen Antitrypsingehalt zu prüfenden Serums mit $\frac{1}{2}$ —10 resp. 20 Platinösen einer 10%igen Trypsinlösung herstellen und 6—8 Oesen der Mischungen auf Serumplatten verbringen, die hierauf auf 24 Stunden in den Brutschrank von 55° gestellt werden. Danach wird geprüft, welche Mischungen noch Dellenbildung veranlaßt haben und welche nicht. Während beim Normalserum bei einer Mischung mit Trypsin im Verhältnis 1:3 oder 1:4 die Dellenbildung ausbleibt, findet bei Karzinom und perniziöser Anämie bisweilen eine Hemmung noch bei den Mischungen im Verhältnis von 1:10 statt.

Ferner wird häufig auf das Ausbleiben der tryptischen Lösung gefärbter Fibrinflocken geprüft. Wohlgemuth⁵⁾ empfiehlt zu diesem Zwecke, zwei Reagenzgläser mit der erforderlichen Menge Trypsinlösung zu beschicken, hierauf zu dem einen Gläschen das antitrypsinhaltige Serum, zu dem anderen die gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung zu setzen und die Reaktionsgemische während einer Viertelstunde bei Zimmertemperatur sich selbst zu überlassen. Dann wird jedem Gläschen dieselbe Menge gefärbten Fibrins zugesetzt und die Mischungen in den Brutschrank von 37° verbracht. Im Gegensatz zu der Kontrollprobe, in der nach relativ kurzer Zeit Auflösung der Fibrinflocke unter mehr oder weniger starker Färbung der Lösung stattfindet, zeigt die antitrypsinhaltige Probe erst nach längerer Zeit eine Veränderung.

Für die quantitative Antitrypsinbestimmung wird hauptsächlich die Methode von Fuld-Groß benutzt: Eine Reihe von Reagenzgläsern wird mit von 1 bis 0,1 ccm fallenden Mengen einer auf das

¹⁾ Mintz, Fol. serol. 6 (1910) 279.

²⁾ Barlocco, Pathologica 1, 352; Biochem. Zentralbl. 10, 1068.

³⁾ Eve, Brit. Med. Journ. (1910) I, 1540.

⁴⁾ Brieger u. Trebing, Berliner klin. Wochenschr. (1908) Nr. 22; vgl. auch über die Methode der Dellenbildung auf der Serumplatte Schlecht u. Wittmund, Archiv f. klin. Medizin 106 (1912) 517.

⁵⁾ Wohlgemuth, Grundriß der Fermentmethoden, Berlin 1913, S. 194.

50fache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Trypsinstandardlösung¹⁾ beschickt und hierauf mittels physiologischer Kochsalzlösung in allen Gläschen das Volumen von 1 ccm hergestellt. Dann erhält jedes Gläschen einen Zusatz von 1 ccm des mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Serums, und zugleich wird zu einer genau gleichen Reihe statt des Serums dieselbe Menge physiologischer Kochsalzlösung hinzugefügt. Hierauf verbleiben die beiden Gläschenreihen während einer Viertelstunde bei Zimmertemperatur, um eine ausreichende Wechselwirkung zwischen dem Trypsin und Antitrypsin zu ermöglichen. Danach erhält jedes Gläschen des Hauptversuches wie jedes Gläschen des Kontrollversuches einen Zusatz von je 2 ccm einer 1‰igen, mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellten Kaseinlösung. Nun werden alle Reaktionsgemische gleichzeitig in ein Wasserbad von 38—40° C verbracht, in dem sie während einer halben Stunde verbleiben. Nach dem Herausnehmen werden sie rasch abgekühlt und mit je sechs Tropfen einer essigsäuren alkoholischen Lösung versetzt. Man stellt nunmehr in beiden Reihen fest, in welchen Gläschen bei diesem Zusatz noch eine Trübung durch unverdautes Kasein auftritt.

An Stelle dieser Ausführungsweise kann man auch die geringste noch hemmende Wirkung des antitrypsinhaltigen Serums aufsuchen. Zu diesem Zweck wird zunächst ermittelt, welcher Verdünnungsgrad der Trypsinstandardlösung gerade noch hinreicht, um 2 ccm einer 1‰igen Kaseinlösung während einer halben Stunde bei 38° (Wasserbad) soweit zu verdauen, daß nach dieser Zeit sechs Tropfen einer essigsäuren, alkoholischen Lösung keine Fällung mehr hervorrufen.

Zeigt sich z. B. bei der Vorversuchsreihe, daß in dem 0,004 ccm der Trypsinstandardlösung enthaltenden Gläschen die Kaseinfällung gerade unter den angegebenen Bedingungen ausbleibt, so müßte 1 ccm der Trypsinstandardlösung mittels physiologischer Kochsalzlösung auf $\frac{1}{0,004} = 250$ verdünnt werden. Zu den mit absteigenden Mengen (von 1 bis 0,1 ccm) des auf das 100fache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Serums beschickten Gläschen, in welchen das an 1 ccm fehlende Volumen mittels physiologischer Kochsalzlösung ergänzt wird, fügt man nun je 1 ccm der in der angegebenen Weise verdünnten Trypsinstandardlösung und nach $\frac{1}{4}$ stündigem Stehen bei Zimmertemperatur je 2 ccm der 1‰igen Kaseinlösung. Alle Reaktionsgemische werden dann gleichzeitig auf 30 Minuten in ein Wasserbad

¹⁾ Hergestellt durch Auflösen von 1 g Pankreatin Rhenania in 50 ccm Wasser, häufiges Schütteln, Abfiltrieren des Rückstandes nach einigem Stehen im Eisschrank und Versetzen der klaren Lösung mit derselben Menge Glycerin. puriss.

von 38° C. verbracht, darauf rasch abgekühlt und durch Zusatz des essigsauren Alkohols dasjenige Gläschen aufgesucht, in dem gerade noch unverdautes Kasein vorhanden ist. Dieses Gläschen enthält also die zur Hemmung der Trypsinwirkung gerade ausreichende Serummenge, die dementsprechend als Einheit gesetzt wird. Betrug diese z. B. 0,6 ccm des verdünnten Serums, so braucht man nur den auf das unverdünnte Serum umgerechneten Wert in 1 zu dividieren, um die Anzahl Antitrypsineinheiten aufzufinden, die 1 ccm des geprüften Serums enthält; das sind also im vorliegenden Falle $\frac{1}{0,006} = 166,666$ Antitrypsineinheiten.

Alle die genannten Verfahren können mit zweckmäßigen Aenderungen des Verdünnungsgrades, der sich nach dem Antitrypsingehalt des zu untersuchenden Materials richtet, auch auf andere, auf Antitrypsin zu prüfende Flüssigkeiten angewendet werden; so auf den Harn, in welchen bei Nephritiden und sonstigen Nierenschädigungen Antitrypsin aus dem Blute übergehen kann¹⁾.

Gewissermaßen einen Uebergang zu den im folgenden besprochenen Verfahren zur Untersuchung auf Antilab bildet die Prüfungsmethode auf Antitrypsin, deren sich Kämmerer bedient hat²⁾. Er betrachtet als Charakteristikum der antitryptischen Wirkung das Ausbleiben der in durchsichtigen Kaseinlösungen leicht wahrnehmbaren Plasteinreaktion.

Die Plasteinreaktion. Am besten eignen sich Albumosen und Peptone als Substrat für die Ausführung der Plasteinreaktion. Diese Reaktion, welche Danilewsky (1886) und Akunew einem besonderen Ferment, dem Plasteinferment³⁾, zuschrieben, wird heute meist als eine Folge der resynthetischen Wirkung⁴⁾ sämtlicher tierischer und pflanzlicher Proteasen⁵⁾ angesprochen.

Im einzelnen wurde die Bildung von Niederschlägen — den Plasteinen oder Koagulinen — in konzentrierten Albumoselösungen

¹⁾ Bauer u. Reich, Med. Klinik (1909) 46, (1910) 65; Hirata, Biochem. Zeitschr. 27 (1910) 397; Schippers, Archiv f. klin. Medizin 101 (1911) 543.

²⁾ Kämmerer, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 6 (1911) 235.

³⁾ Siehe Kurajeff, Hofmeisters Beitr. 1 (1901) 121, 2 (1902) 411, 4 (1904) 476; Kurajeff u. Großmann, Ebenda 6 (1905) 192, 7 (1905) 165.

⁴⁾ Für eine Resynthese sprechen vor allem die Untersuchungen von Herzog, Zeitschr. f. physiol. Chem. 39 (1903) 305; Micheli, Arch. sc. med. 30 (1906); Biochem. Zentralbl. 6, 98; Sawjalow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 54 (1907) 119; Robertson, Journ. Biol. Chem. 3 (1907) 95, 5 (1908) 493, 8 (1910) 287, 9 (1910) 295, 12 (1912) 233; Henriques u. Gjaldbaek, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71 (1911) 485, 81 (1912) 439; Glagolew, Biochem. Zeitschr. 50 (1913) 162 u. Kurajeff, loc. cit. vorige Fußnote.

⁵⁾ Rakoczy, Zeitschr. f. physiol. Chem. 75 (1911) 273.

beobachtet unter dem Einfluß von Extrakten von Organautolysaten durch Nürnberg¹⁾, von aktiviertem Pankreassaft durch Delezenne und Mouton²⁾, von Pawlowschem Magensaft, Pankreasextrakt und Darmsaft durch London³⁾, von Pflanzenproteasen durch Kurajeff (loc. cit.) und Gerber⁴⁾. Nach Sawjalow⁵⁾ und Lukomnik⁶⁾ gibt es auch lösliche Plasteine, und sie halten die Ausflockung für sekundärer Natur. Nach dem letztgenannten Forscher wäre die Koagulation lediglich eine Folge des Kalziumgehaltes, während Kaliumsalze fällungshindernd wirken. Dies legt den Gedanken nahe, daß es sich bei den beobachteten Phänomenen nicht um einen Aufbau, sondern um einen Abbau der ersten Eiweißspaltprodukte unter Bildung eines festen Produktes gehandelt haben könnte, also um eine an den ersten Eiweißabbauprodukten noch zutage tretende Labwirkung.

Da die Labwirkung, wie früher schon eingehend besprochen wurde, überhaupt nur die erste Spaltungsphase in sich schließt, verliert die hier der Resynthese gegenüber erörterte Möglichkeit einer Spaltung in dem Maße an Wahrscheinlichkeit, als sich die Plasteinbildung an tieferen Abbauprodukten dokumentiert.

Nun sind aber nach Lawrow⁷⁾ und Sawjalow⁸⁾ echte Peptone überhaupt nicht mehr koagulabel, und die Albumosen in dem Maß weniger, als sie sich mit sinkendem Molekulargewicht den Peptonen nähern.

Dieses unterschiedliche Verhalten der Albumosen wird wohl die Ursache dafür sein, daß es Sawjalow⁹⁾ nicht gelang Plasteinbildung in reinen Albumoselösungen zu erzielen, sondern nur in dem Gemisch aller Albumosefraktionen, die also auch die dem unveränderten Eiweiß am nächsten stehenden Albumosen enthalten. Alle an den hochmolekularen Eiweißspaltprodukten beobachteten Niederschlagsbildungen könnten daher auch durch die „Labwirkung“ der Protease verursacht sein. Eine Entscheidung, ob es sich bei der Koagulation um nichts anderes als um eine „labende“ Begleiterscheinung der proteolytischen Spaltung handelt oder um eine Resynthese, muß daher

¹⁾ Nürnberg, Hofmeisters Beitr. 4 (1904) 543.

²⁾ Delezenne u. Mouton, Soc. Biol. 63 (1907) 277.

³⁾ London, Zeitschr. f. physiol. Chem. 74 (1911) 301.

⁴⁾ Gerber, Soc. Biol. 67, 322.

⁵⁾ Sawjalow, Zentralbl. f. Physiol. 16 (1903) Nr. 22.

⁶⁾ Lukomnik, Hofmeisters Beitr. 9 (1907) 205.

⁷⁾ Lawrow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 26 (1898) 513.

⁸⁾ Sawjalow, Archiv f. d. ges. Physiol. 85 (1910) 171.

⁹⁾ Sawjalow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 54 (1907) 119.

von Fall zu Fall auf Grund der Untersuchung der Niederschläge getroffen werden. Die Ergebnisse auf diesem Gebiete scheinen nun darauf hinzuweisen, daß im Sinne der beiden besprochenen Möglichkeiten unter dem Begriff der Plasteine ganz heterogene Produkte ¹⁾ — die entgegengesetzten spaltenden und resynthetisierenden Vorgängen entstammen — zusammengefaßt werden. So dürfte es sich bei jenen „Plasteinen“, für welche eine albumoseartige Natur ²⁾ oder eine noch einfachere Zusammensetzung ³⁾ festgestellt wird ⁴⁾, eher um Spaltungs- als um synthetische Produkte handeln.

Dagegen liegen in anderen Fällen zweifellos Produkte der Resynthese vor. So konnten Henriques und Gjaldbaek (loc. cit.) sowie Glagolew (loc. cit.) mittels der Sörensenmethode einwandfrei den Nachweis führen, daß die von ihnen erhaltenen Plasteine weniger Aminostickstoff enthalten als das Eiweißspaltgemisch, aus welchem sie in salzsaurer konzentrierter Lösung hervorgehen; sie müssen also die Natur eines Kondensationsproduktes, bei welchem die Aminogruppen in Reaktion getreten sind, besitzen. Zugleich wiesen die beiden Forscher nach, daß sich Spaltung oder Bindung, den theoretischen Voraussetzungen entsprechend, durch Konzentrationsänderungen des Gemisches regulieren läßt.

Die Prüfung auf Plasteinbildung ⁵⁾ unter dem Einfluß irgend eines proteasehaltigen Untersuchungsmaterials erfolgt in der Weise, daß 10 ccm einer möglichst konzentrierten — zum mindesten 10%igen — Wittepeptonlösung oder 10 ccm eines aus Fibrin, Kasein, Muskelfleisch oder Eialbumin selbst hergestellten Spaltgemisches mit 2—4 ccm der zu prüfenden Lösung und, wenn die Versuchsdauer dies verlangt, mit Toluol als Antiseptikum vermischt werden. Hierauf überläßt man das Reaktionsgemisch im Brutschrank von 40° sich selbst und prüft nach einigen Stunden und — wenn die Reaktion noch nicht wahrnehmbar ist — nach 24 Stunden auf eine Trübung bis dichte Niederschlags-

¹⁾ Ueber die Anwendung der Präzipitinreaktion zur Untersuchung der Plasteine siehe Herrmann u. Chaim, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **77** (1912) 289.

²⁾ Lawrow u. Salaskin, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **36** (1902) 277; vgl. auch Lawrow, *Ebenda* **51** (1907) 1, **53** (1907) 1, **56** (1908) 343, **60** (1909) 520; Levene u. van Slyke, *Biochem. Zeitschr.* **16** (1909) 203.

³⁾ Bayer, *Hofmeisters Beitr.* **4** (1904) 554.

⁴⁾ Ueber weitere Versuche, die Konstitution der Plasteine durch die Untersuchung ihrer Spaltprodukte festzustellen, siehe Rosenfeld, *Hofmeisters Beitr.* **9** (1907) 215; Levene u. van Slyke, *Biochem. Zeitschr.* **13** (1908) 458.

⁵⁾ Siehe Wohlgemuth, *Grundriß der Fermentmethoden*, Berlin 1913, S. 181, 182

bildung. Bei sehr starker Wirkung kann die Umwandlung des ganzen Reaktionsgemisches zur Gallerte stattfinden. Ein quantitatives Maß für den Grad der Plasteinbildung bildet die schon erwähnte Formoltitrierung nach Sørensen.

Die Ermittlung von Antilab in Körperflüssigkeiten. Der bei der Immunisierung gegen die labende Wirkung von Proteasen im Serum gebildete spezifische Antikörper kann in analytischer Beziehung in Betracht kommen, wenn es sich darum handelt, die Herkunft eines labenden Präparates zu ermitteln, da das Antilab der Kalbschymase nach Moro¹⁾ 40mal schwächer auf das Lab des menschlichen Säuglingsmagens als auf Kälberlab einwirkt.

Es kann aber auch die Ermittlung des normalen Antilabs eines Blutserums oder Harnes oder der Milch (Frauenmilch) in Frage kommen. Beim Blutserum, in welchem die Antilabwirkung bei schweren Krankheiten vermindert ist²⁾, kann nach Bang³⁾ eine Trennung von Lab und Antilab durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat gelingen; wenigstens haftet der bei 28–33 % Ammoniumsulfatgehalt ausfallenden Euglobulinfraktion die Labwirkung, der bei 34–46 % Ammoniumsulfatgehalt gefällten Pseudoglobulinfraktion die Antilabwirkung an.

Der Nachweis von Antilab erfolgt in der Weise, daß man z. B. 1 ccm Serum einem Reagenzgläschen hinzufügt, das mit der zur Auflösung der Gerinnung erforderlichen Labmenge versetzt worden ist. Man fügt dann zu diesem Gläschen und einem Kontrollgläschen, das die gleiche Labmenge, aber statt des Serums 1 ccm physiologische Kochsalzlösung enthält, je 10 ccm Milch und stellt die Reaktionsgemische in den Brutschrank. Die Gegenwart des Antilabs gibt sich dann durch eine mehr oder weniger ausgeprägte Verzögerung der Gerinnung beim Hauptversuch gegenüber dem Kontrollversuch zu erkennen. Bei der quantitativen Ausführung werden zwei Serien Reagenzgläschen mit absteigenden, durch physiologische Kochsalzlösung hergestellten Verdünnungen einer Labstandardlösung beschickt, welche letztere durch Lösen von Labpulver in Wasser oder Extraktion getrockneter Magenschleimhaut mittels Glycerins oder verdünnter Salzsäure gewonnen wird. Zu der einen Serie von Reagenzgläsern wird je 1 ccm Serum, zu der anderen je 1 ccm physiologische Kochsalzlösung gefügt. Nach $\frac{1}{4}$ stündigem Stehen bei Zimmertemperatur er-

¹⁾ Moro, Zentralbl. f. Bakteriöl. 37 (1904) 485.

²⁾ Achard u. Clerc, Compt. rend. 130 (1900) 1727.

³⁾ Bang, Hofmeisters Beitr 5 (1904) 395.

hält jedes Gläschen der beiden Reihen einen Zusatz von 1 ccm Milch und wird kräftig geschüttelt. Dann kommen alle Proben 2 Stunden in ein Wasserbad von 16—17° C und darauf während 10 Minuten in ein Wasserbad von 38°, worauf abgekühlt wird. In beiden Reihen sucht man nun die geringste Fermentmenge auf, welche gerade eben vollständige Gerinnung erzeugte.

Man kann aber auch so verfahren¹⁾, daß zunächst in einem Vorversuch die geringste Menge Lab aufgesucht wird, welche 5 ccm Milch während 2stündigem Verweilen im Wasserbad von 16—17° und danach 10 Minuten dauerndem Aufenthalt im Wasserbad von 38° völlig zur Gerinnung bringt. Die Labstandardlösung wird nun so weit mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, daß sie in 1 ccm die ermittelte Labmenge (Minimalmenge) enthält. Je 1 ccm der so verdünnten Lablösung wird dann zu den in der gewohnten Weise hergestellten Serumverdünnungen gefügt und nach 15 Minuten langem Stehen bei Zimmertemperatur jede Probe mit 5 ccm Milch versetzt. Nach 2stündigem Aufenthalt der Gläschen im Wasserbad von 16—17° und der Nachbehandlung im Wasserbad von 38° während 10 Minuten wird wieder abgekühlt und das Gläschen festgestellt, in welchem eben die Gerinnung ausgeblieben ist.

Die Ermittlung von Antipepsin in Körperflüssigkeiten. Relativ geringe analytische Bedeutung besitzt das schon früher genannte Antipepsin, da ihm trotz seiner Verbreitung im Tier- und Pflanzenreich²⁾ im Gegensatz zum Antitrypsin vorläufig kaum eine diagnostische Bedeutung zukommt. Zur Ermittlung des Antipepsins kann jede Pepsinbestimmungsmethode dienen, die eine exakte Feststellung des negativen Ausfalls ermöglicht. So eignet sich für den Nachweis in irgend einem Körpersaft, z. B. im Serum, die Methode von Grützner, wobei auf das Ausbleiben der Rotfärbung in den mit Pepsin, dem Antipepsin führenden Material und einer Karminfibrinflocke beschickten Gläschen abgestellt wird. Neben dem Hauptversuch, bei welchem $\frac{1}{2}$ oder 1 ccm 1%iger Pepsinlösung Grubler mit der doppelten Menge Serum während einer halben Stunde in Berührung gelassen und hierauf mit der Karminfibrinflocke versetzt, eine weitere halbe Stunde sich selbst überlassen bleibt, wird gleichzeitig und unter genau denselben Bedingungen ein Kontrollversuch

¹⁾ Wohlgemuth, Grundriß der Fermentmethoden, Berlin 1913, S. 173.

²⁾ Ueber Antipepsin in Saccharomyzeten und anderen Pilzen sowie in Bakterien siehe Krasnogorski, Nachrichten der milit. med. Akad. 12 (1906); Biochem. Zentralbl. 5 (1906) 1178.

angesetzt, bei welchem das Serum durch dieselbe Menge physiologischer Kochsalzlösung ersetzt wird. Die Fibrinflocken beider Versuche werden nach Ablauf der halben Stunde gleichzeitig in je zwei Reagenzgläser übertragen und mit derselben Menge (3—4 ccm) n/30-Salzsäure während einer Stunde im Brutschrank digeriert. Hierbei zeigt der Kontrollversuch, in welchem die Pepsinwirkung unvermindert zur Geltung kommt, schon binnen kurzer Zeit Auflösung der Flocke und Rotfärbung der Lösung, während im Hauptversuch, auch nach viel längerer Zeit, keine Veränderung wahrzunehmen ist.

In derselben Weise verfährt man bei der quantitativen Bestimmung mittelst einer Reihe absteigender Mengen einer neutralen Pepsinstandardlösung und stellt die größte Pepsinmenge fest, die durch 1 ccm des betreffenden Serums oder einer 10fachen Verdünnung desselben gerade eben vollständig gehemmt wird. Liegt an Stelle eines Serums Magensaft zur Untersuchung auf seinen Antipepsinwert vor, so kann man nach vorheriger Eliminierung des Pepsins durch Kochen oder durch 24—48stündiges Behandeln mit wiederholten Zusätzen von Fibrin oder koaguliertem Eiereiweiß im Eisschrank genau in derselben Weise verfahren. Auch kann man an Stelle des Karminfibrins Mettsche Eiweißkapillaren in die zu untersuchenden Mischungen einlegen und auf das Ausbleiben einer Andauung des Eiweißzylinders prüfen, wie Blum und Fuld¹⁾ gezeigt haben.

Wo es sich nicht um eine Störung der hemmenden Wirkung des Antipepsins bzw. um die Ueberwindung einer bestehenden Hemmung durch die die Pepsinwirkung aktivierende Salzsäure handelt (was z. B. bei der Ermittlung des Antipepsins im Magensaft wie bei der Antipepsinbestimmung im Pferdeserum²⁾ in Frage kommt), können auch die wie vorhin hergestellten und vorbehandelten Mischungen absteigender Mengen einer Pepsinstandardlösung oder einer 10fachen Verdünnung derselben + je 1 ccm des zu prüfenden antipepsinführenden Serums (resp. bei den Kontrollen mit je 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung) mit je 1 ccm n/10-Salzsäure und je 2 ccm 1%oiger Edestinlösung versetzt werden³⁾. Nach 1/2stündigem Stehen bei Zimmertemperatur erhält jedes Gläschen einen Zusatz von zehn Tropfen

¹⁾ Blum u. Fuld, Zeitschr. f. klin. Medizin 58, Heft 5 u. 6.

²⁾ Diejenigen Forscher, die auf dem Boden stehen, daß es sich bei der Hemmungswirkung des Antipepsins gegenüber dem Pepsin um eine chemische Bindung handelt [Morgenroth, Berliner klin. Wochenschr. (1909) 758], betrachten die Wirkung der Salzsäure als eine Sprengung der im Pferdeserum nur lockeren Bindung zwischen Pepsin und Antipepsin.

³⁾ Siehe Wohlgemuth, loc. cit. Fußnote 1, vorige Seite, S. 158, 159.

konzentrierter Kochsalzlösung, und man sucht nun in der Hauptreihe wie in der Kontrollreihe dasjenige Gläschen heraus, in dem gerade noch eine Trübung durch das ausfallende, unveränderte Edestin wahrnehmbar ist.

An Stelle der Edestinprobe kann die Rizinprobe in der angegebenen Weise Verwendung finden. Die letztere empfiehlt Oguro¹⁾ auch in der Form auszuführen, daß man in einem Vorversuch die geringste Pepsinquantität feststellt, die 2 ccm der früher beschriebenen Rizinlösung bei der Temperatur von 38° innerhalb einer halben Stunde aufzuhellen vermag. Mit dieser Pepsinmenge werden nun eine Reihe von Reagenzgläsern beschickt, mit steigenden Mengen des betreffenden 10fach verdünnten Serums vermischt und während einer halben Stunde im Wasserbad von 38° sich selbst überlassen. Danach erhält jedes Gläschen einen Zusatz von $\frac{1}{2}$ ccm n/10-Salzsäure und je 2 ccm der Rizinlösung. Von Stunde zu Stunde — oder eventuell auch in kürzeren Intervallen — wird dann der die Intensität der Anti-pepsinwirkung bestimmende Aufhellungsgrad in den Versuchsgläschen festgestellt.

Der lytische Immunkörper und die Abwehrfermente.

Nachweis und Bestimmung der normalen Blutprotease, als deren Äußerungen uns einerseits die einem besonderen Fibrin- und Labferment zugeschriebenen Erscheinungen der Blut- und Milchgerinnung und anderseits die den humoralen Bakteriozidinen zuerkannten, verschiedenartig sich äußernden bakteriziden und proteolytischen Fähigkeiten des Blutes²⁾ erschienen sind, besitzen jedoch nicht im entferntesten die Bedeutung, welche der Ermittlung der humoralen Bakteriozidine zukommt, die durch Anpassung des Ambozeptors an in die Blutbahn gelangte artfremde Eiweißkörper spezifisch geworden sind.

¹⁾ Oguro, Biochem. Zeitschr. 22 (1909) 275.

²⁾ Es ist eine selbstverständliche Konsequenz der hier vertretenen Auffassung, daß ein Serum von höherem gegenüber einem solchen von niedrigerem, normalen Proteasegehalt, seine stärkere lytische Wirksamkeit gegenüber sämtlichen Bakterien, mit denen die Sera in Berührung kommen, entfalten wird, und daß diese Beziehung bei allen Reaktionen des normalen Lysins beobachtet werden kann. Für die der ersten Phase der Eiweißverdauung entsprechende Bakterienagglutination ist dies durch Bürgi erwiesen worden, dessen Versuche mit einer Anzahl verschiedener Sera und einer Anzahl verschiedener Bakterien sich dahin zusammenfassen lassen, daß die Sera verschiedener Tiere ungleiche Mengen normales „Agglutinin“ enthalten, daß sich aber die in irgendeinem Fall vorhandene Agglutininquantität gegenüber allen Bakterien in gleichem Maße äußert.

Diese als lytischer Immunkörper bezeichnete Protease beherrscht mit ihren, von den Reaktionen der normalen Protease übrigens nur durch den Eintritt bei viel höheren Verdünnungen¹⁾ unterschiedenen Reaktionen, die in der ganzen analytischen Chemie, was Mannigfaltigkeit und Originalität anbetrifft, ihresgleichen nicht besitzen, die moderne Serum-analyse und Serundiagnostik.

Auf die Zurückführung all dieser Reaktionen auf das nämliche fermentative Grundprinzip sind wir schon bei der Labwirkung eingegangen; auch erübrigt sich eine nochmalige Erörterung des Unterschieds, der zwischen den beiden Fällungsreaktionen und den übrigen Nachweismethoden des lytischen Immunkörpers besteht.

Die Präzipitinreaktion und ihre Anwendungen.

Die Anwendung zur Typhusdiagnose nach Ficker und andere klinische Präzipitinmethoden: Der Präzipitinreaktion, welche wir der ohne Aktivator verlaufenden ersten Eiweißspaltungsphase, die der Labwirkung der Proteasen entspricht, an die Seite gestellt haben, kommt bei Typhus große Bedeutung zu. Man bedient sich des von Merck in Handel gebrachten Fickerschen Diagnostikums, das durch Auslaugen des Eiweißes abgetöteter Typhusbazillen hergestellt wird.

Bei der Ausführung der Fickerschen Reaktion werden 0,9 ccm der Typhusbazilleneiweißlösung (Diagnostikum) mit je 0,1 ccm von Serumverdünnungen 1:5 und 1:10 vermischt und nebst einer Kontrolle mit Normalserum 2 Stunden in den Brutschrank gestellt. Findet Präzipitation bei der stärkeren Verdünnung statt, so liegt Typhus vor.

Die Präzipitinmethode ist von Citron²⁾ bei verschiedenen Krankheiten auch für Stuhl- und Magensaftuntersuchungen, wo das anaphylaktische und das Komplementbindungsverfahren nicht verwendet werden können, mit Erfolg in Anwendung gebracht worden.

Als eine Präzipitationsprobe kann ferner die Niederschlagsreaktion betrachtet werden, welche Neuberg für die Diagnose maligner Tumoren empfohlen hat. Danach werden je 3 ccm aufgekochtes, filtriertes, klares Karzinomextrakt³⁾ einerseits mit Patientenserum, ander-

¹⁾ Der Nachweis normalen Agglutinins ist z. B. nur an Vollserum oder ganz geringen Verdünnungen, höchstens 1:10 möglich, während spezifisches Agglutinin noch bei einer 2000fachen Verdünnung des Immunserums wahrgenommen werden kann.

²⁾ Citron, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 36 (1911) 358.

³⁾ Es kann statt dessen auch nicht gekochtes, opaleszierendes Extrakt verwendet werden.

seits mit Normalserum versetzt. Findet im Patientenserum Niederschlagsbildung statt, so kann die Diagnose Karzinom gestellt werden.

Die Anwendung der Präzipitinreaktion zur Eiweißdifferenzierung höherer Tiere.

Noch wichtiger ist die Präzipitation für die Differenzierung des Eiweißes höherer Tiere.

Die Erkennung der Blutsverwandtschaft. Theoretisch von größter Tragweite ist die Methode für die Erkennung der Blutsverwandtschaft geworden. Deutlicher als alle Knochenfunde beweist sie die enge verwandtschaftliche Zusammengehörigkeit von Mensch und Affe. Der präzipitierende Gegenkörper, der durch Behandlung eines Kaninchens mit Menscheneiweiß erzeugt wird, richtet sich nicht allein gegen dieses Eiweiß, sondern auch gegen Affeneiweiß und umgekehrt, während das erhaltene Immuneserum gegenüber jedem anderen Eiweiß indifferent ist. Der Nachweis der Blutsverwandtschaft läßt sich auf dem nämlichen Wege für Pferd und Esel, sowie für Hund und Fuchs führen, während sich in anderen Fällen hier wie bei der noch empfindlicheren Komplementbindungsmethode keine nahe Verwandtschaft ergeben hat¹⁾. Auch bei niederen Tieren und bei Pflanzen, bei welchen die Eiweißdifferenzierung auf diesem Wege wie mittels des Komplementbindungsverfahrens häufig gelingt²⁾, wird man mit Hilfe der Präzipitinmethode zu den interessantesten entwicklungsgeschichtlichen Perspektiven geführt.

Die Präzipitinreaktion kann dadurch empfindlicher gestaltet werden, daß das vorwiegend durch Bestandteile des Antiserums gebildete Präzipitat³⁾ von Pflanzeneiweiß und dessen Immuneserum — auch wenn es so schwach ist, daß es makroskopisch nicht wahrgenommen wird — mit Rinderserum eine Konglutinationsreaktion ergibt⁴⁾.

Es ist auch versucht worden, Unterschiede der verschiedenen Eiweißkörper desselben Individuums mittels des Präzipitinverfahrens wie auch der Komplementbindungsmethode nachzuweisen, doch konnte

¹⁾ So z. B. nach Steppenhausen u. Schoenburg, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap. 8 (1911) 563, bei Ratten- und Mäuseeiweiß.

²⁾ Siehe Wendelstadt u. Toni Fellmer, loc. cit. im folgenden.

³⁾ Welsh u. Chapman, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 9 (1911) 516.

⁴⁾ Niesner u. Rewald, Ebenda 2, 323; Steeg, Ebenda 2, 415; Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde, I. Abteil. 52, 523; Sauli, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 9 (1911) 359.

nur beim Kasein eine geringgradige konstante Spezifität gegenüber den Molkenproteinen und dem Eiweiß des Blutserums festgestellt werden ¹⁾).

Der forensische Blutnachweis. Kommt dem Blutsverwandtschaftsnachweis vorwiegend theoretische Bedeutung zu, so ist anderseits auch von eminenter praktischer Wichtigkeit die Verwendung der Präzipitationsmethode für den forensischen Blutnachweis und zum Nachweis von Nahrungsmittelverfälschungen.

Ehe das Präzipitationsphänomen bekannt war, war es dem gerichtlichen Mediziner und Chemiker nicht möglich zu entscheiden, ob ein zur Untersuchung gelangender Blutfleck menschlichen oder tierischen Ursprungs war. Daher folgte der Entdeckung der Reaktion auf dem Fuße deren Umsetzung in die Praxis der gerichtlichen Medizin und Chemie durch Uhlenhuth und unabhängig von ihm durch Wassermann und Schütz.

Um das präzipitierende Serum zu gewinnen, spritzt man einem Kaninchen 3—4 mal Menschenserum ein. Es existieren hierfür verschiedene Vorschriften. Nach Much ²⁾ werden in die Ohrvene 1—2 ccm Serum eingespritzt und die Prozedur alle 6 Tage wiederholt. Am Bakteriologischen Institut der Universität Freiburg (Schweiz) werden viel höhere Dosen, aber subkutan, einverleibt. So spritzt man z. B. am ersten Tag 5 ccm, am zweiten 10 ccm und am dritten 15 ccm Menschenserum unter die Haut und entblutet nach 8 Tagen die nicht infolge der Ueberempfindlichkeit zugrunde gegangenen Tiere, sobald man sich durch eine Probeentnahme von Blut aus der Ohrvene davon überzeugt hat, daß das Serum genügend an Präzipitinen angereichert ist. Das so erhaltene Antimenschenserum wird nach der Vorschrift von Much (loc. cit. S. 120) in der Weise geprüft, daß man sich mit normalem Menschenserum und physiologischer Kochsalzlösung Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10 000, 1:20 000 und 1:50 000 herstellt, hiervon je 1 ccm mit 0,1 ccm des dem vorbehandelten Kaninchen entzogenen Antimenschenserums vermischt, die Mischungen nebst einer Kontrolle 0,1 ccm Antiserum, + 1 ccm physiologische Kochsalzlösung eine halbe Stunde in den auf 37° gehaltenen Brutschrank stellt und danach die Präzipitation beobachtet, welche mindestens bis zur Verdünnung 1:5000 starke Ausflockung zeigen soll.

Ist dies der Fall, so kann das Serum für den forensischen Blut-

¹⁾ Bauer, Ebenda I. Teil 7 (1910) 417; Bauereisen, Ebenda 10 (1911) 306; Kollmeyer, Zeitschr. f. Biol. 54 (1910) 64.

²⁾ Much, Immunitätswissenschaft, 1911, S. 119.

nachweis herangezogen werden. Hierfür fordert Uhlenhuth, daß 0,1 ccm des Antimenschenserums in der Verdünnung von 1:1000 innerhalb 1—2 Minuten eine Trübung gibt, während anderes Tier-serum noch nach 20 Minuten in der Verdünnung 1:200 keine Trübung erkennen läßt.

Das mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellte Extrakt des Blutfleckens soll ungefähr der Verdünnung 1:1000 entsprechen. Die betreffende Lösung zeigt dann bei der Kochprobe nur eine schwache Trübung. Bei stärkerer Trübung oder Fällung muß das Extrakt so lange verdünnt werden, bis es dem Uhlenhuthschen Kriterium genügt. Hierauf mischt man 1 ccm des in der erwähnten Weise behandelten Extrakts mit 0,1 ccm des vom Kaninchen stammenden Antimenschenserums, setzt gleichzeitig eine Kontrolle 0,1 ccm Antimenschenserum + 1 ccm physiologische Kochsalzlösung an und beobachtet nach 5 Minuten und 20 Minuten. Findet man im ersten Fall eine Trübung, im zweiten eine Ausflockung, während die Kochsalzlösung klar geblieben ist, so handelt es sich um Menschenblut.

Man kann auch für den gerichtlichen Blutnachweis, speziell gegen den Blutfarbstoff eingestellte „Erythropräzipitine“¹⁾, welche Leers²⁾ in Vorschlag gebracht hat, verwenden. Doch soll die Empfindlichkeit der gewöhnlichen Serumpräzipitinreaktion größer sein³⁾.

Die Untersuchung auf Nahrungsmittelverfälschung. In ganz analoger Weise wie bei der Differenzierung von Menschen- und Tierblut erfolgt die Prüfung auf Nahrungsmittelverfälschung.

Der Pferdefleischnachweis. Will man z. B. Pferdefleisch in einer Wurst nachweisen, so spritzt man einem Kaninchen zu verschiedenen Malen Pferdeserum ein und zwar am besten erhitztes Serum, da der gebildete Antikörper in diesem Fall sowohl gegen erhitztes wie gegen genuines Eiweiß gerichtet ist, während bei der Einspritzung von genuinem Eiweiß nur gegen dieses, nicht aber gegen verändertes Eiweiß Antikörper erzeugt werden.

Eine Anleitung zur Herstellung von Antiserum zur Erkennung von Pferdefleisch in Wurstwaren gibt unter anderem Saint-Seruin⁴⁾. Auch weist derselbe darauf hin, daß bestimmte Konservierungsmittel, wie Azeton, Formaldehyd und schweflige Säure die Präzipitation verhindern können, während Menthol, Kampfer und Guajakol einflußlos sind.

¹⁾ Durch Vorbehandeln von Kaninchen mit dem Hämoglobin des Blutes erhalten.

²⁾ Leers, Zentralbl. f. Bakteriologie u. Parasitenkunde 54, Heft 5.

³⁾ Mirto, Arch. di Pharmacologia sperimentale 12 (1911) 145.

⁴⁾ Saint-Seruin, Ann. des falsific. 4 (1911) 334.

Das Antiserum wird unter den vorhin erwähnten, von Uhlenhuth angegebenen Kautelen mit dem Extrakt aus der betreffenden Wurst zusammengebracht. Tritt eine Präzipitation auf, so beweist dies die Gegenwart von Pferdefleisch.

In bezug auf die Details der Ausführung¹⁾ sei die Vorschrift von Blanc²⁾ erwähnt, welcher bei rohen Wurstwaren möglichst steril 25 g fettfreier Substanz aus der Mitte entnimmt, dieselbe während 48 Stunden bei 0° mit 30—40 ccm physiologischer Kochsalzlösung (8,5‰) extrahiert, filtriert, den Rückstand auspreßt und die vereinigten Auszüge zentrifugiert. Gleichzeitig werden in derselben Weise Vergleichslösungen aus reiner Schweine- und Schweine-Rinderwurst hergestellt. Hierauf werden vier Reagenzgläser von 10 cm Länge und 1 cm Durchmesser mit den zu prüfenden Lösungen und Kontrollen angesetzt, und zwar zwei Gläschen mit je 1 ccm des zu prüfenden Extrakts und je ein Gläschen mit 1 ccm Schweinewurstextrakt und mit 1 ccm Schweine-Rinderwurstextrakt. Die beiden mit Schweinewurst- und Schweine-Rinderwurstextrakt beschickten Gläschen, sowie eines der beiden Gläschen, welche das Extrakt der fraglichen Wurst enthalten, werden nun mit je 0,1 ccm Antiserum versetzt, während das zweite mit dem zu prüfenden Wurstextrakt beschickte Gläschen einen Zusatz von 0,1 ccm normalen Kaninchenserums bekommt. Im Gegensatz zu den drei Kontrollen tritt in dem Gläschen, welches das fragliche Wurstextrakt und das Antiserum enthält, nach 1—2 Minuten eine Trübung auf, die sich allmählich verstärkt und einige Stunden bestehen bleibt, wenn in der betreffenden Wurst mehr als 5 % Pferdefleisch enthalten ist. Bei gekochten Wurstwaren werden die Extrakte nach dem Zentrifugieren auf 90—95° erwärmt und nochmals zentrifugiert, sonst aber gleich wie die rohen behandelt.

Die Echtheitsprüfung von Bienenhonig: Ebenso gute Dienste leistet die Präzipitinmethode für die Honiguntersuchung. Der proteolytische Immunkörper, welcher sich im Kaninchenblut beim Behandeln des Tieres mit dem betreffenden Eiweiß (des Bienenmagens) gegen das letztere einstellt und beim Zusammenbringen des Antiserums mit einem zu prüfenden Honig (der im Falle der Echtheit denselben Bienen-eiweißkörper enthält) die Präzipitation

¹⁾ Siehe z. B. auch die Anleitung zum serodiagnostischen Nachweis von Pferdefleisch in Wurstwaren mittels der Präzipitinmethode von Uhlenhuth u. Weidanz, Schweiz. Wochenschr. f. Chem. u. Pharm. 48 (1910) 723.

²⁾ Blanc, Ann. des falsific. 3 (1910) 516, 4 (1911) 49, 131.

veranlaßt, stellt sogar das einzige, ganz sichere Reagens¹⁾ auf Naturreinheit des Honigs dar. Das Antiserum, welches in Lösungen von Naturhonigen Trübungen verursacht, wurde zuerst von Riegler²⁾ gewonnen, und Langer³⁾ hat die Menge des erhaltenen Präzipitats in quantitativer Hinsicht für die Beurteilung der zu prüfenden Honige (bzw. den Grad ihrer Versetzung mit Kunstprodukten) verwertet⁴⁾.

Die Agglutination und ihre Anwendungen.

Der nämliche Vorgang, der als Präzipitationsphänomen in die Erscheinung tritt, wenn der Immunkörper mit gelöstem Eiweiß, dem er seine Entstehung verdankt, reagiert, äußert sich als Agglutination, wenn das Eiweiß, welches mit dem Immunkörper in Berührung gebracht wird, geformtes, lebendes Bakterienmaterial darstellt.

Die Annahme, daß Präzipitation wie Agglutination ihre Ursache in einer wenig eingreifenden Spaltung, einer nur beginnenden Bakteriolyse besitzen, steht in Uebereinstimmung mit der Tatsache, daß agglutinierte Bakterien noch virulent sein können.

Wie bei der Einwirkung des Pepsins auf Eiweiß in Abwesenheit der aktivierenden Wasserstoffionen nur eine Quellung des Eiweißes, nicht aber eine über das Quellungsstadium hinausgehende Umwandlung stattfindet, so machen sich an der Bakterienmembran unter dem Einfluß der Agglutinine nur leichte Quellungs- und Verflüssigungserscheinungen geltend. Dieselben führen zu einem Verkleben und Zusammenballen der Bakterien zu flockigen, zu Boden sinkenden Riesenaggregaten. Wie bei der fermentativen Blut- und Milchgerinnung der primäre Spaltvorgang den Hauptprozeß darstellt, welcher die Koagulation als Sekundärwirkung nach sich zieht, so folgt bei Agglutination und Präzipitation der latenten Veränderung die markante kolloide Ausflockung nach. Sie ist auch hier, wie Bordet⁵⁾ gezeigt hat, an die Salzgegenwart geknüpft.

Bordet zerlegt den Agglutinationsprozeß in zwei Phasen, deren erste in einer Verankerung des Agglutinins an das zu fällende Eiweiß, die zweite in der Ausflockung des letzteren besteht.

¹⁾ Siehe über die anderen Echtheitsprüfungen von Bienenhonig den Spez. Teil, 1. Abteil. im Kapitel über die Wasserstoffionenkatalyse.

²⁾ Riegler, Oesterreich. Chem.-Ztg. (1902) 97.

³⁾ Langer, Archiv f. Hygiene 71 (1910) 308.

⁴⁾ Siehe ferner Galli-Valerio u. Bornand, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 7 (1910) 331; Thöni, Mitteil. f. Lebensmitteluntersuch. u. Hygiene 2 (1911) 80.

⁵⁾ Bordet, Ann. Inst. Pasteur 13, 225.

Nicht allein die entgegengesetzt geladenen Ionen eines Salzes, sondern auch Kolloide selbst sind auf den Ausflockungsvorgang von Einfluß. Gemäß der Hardyschen Regel sind nur ungleichnamig geladene Kolloide imstande, einander auszufallen, während solche vom selben Vorzeichen sich in Lösung halten. Dies bedingt, daß ein vom überschüssigen Fällungsmittel ungeladenes isoelektrisches Gerinnsel wieder in Lösung zu gehen vermag. Dieses, den Gesetzen der Kolloidchemie entsprechende Phänomen findet sich nun sowohl bei der Agglutination wie bei der Präzipitation in dem für eine bestimmte Konzentration des Antikörpers bestehenden Optimum wieder. In zu konzentrierten wie in zu verdünnten Lösungen kann die Reaktion ausbleiben. Bei Anwendung des Fickerschen Diagnostikums vermag nachträglich hinzugefügtes Bakterieneiweiß eine schon bestehende Ausflockung wieder in Lösung zu bringen. Aber auch die Agglutination kann durch Bakterienextrakte verhindert werden, wie Weil¹⁾ an Typhusbazillen und Choleravibrionen zeigen konnte. Auch stellten Landsteiner und Prašek²⁾ an Präzipitinserum eine Hemmungswirkung gegenüber normalen Hämagglutininen und Bakterienagglutininen fest.

Die Anwendung der Agglutinationsprobe zur Untersuchung von Sera mit bekanntem Bakterienmaterial unter besonderer Berücksichtigung der Gruber-Vidalschen Typhusreaktion. Die Agglutinationsprobe wird sowohl zu diagnostischen Zwecken wie zur Entscheidung entwicklungsgeschichtlicher Probleme herangezogen. Was die praktisch wichtige erste Anwendbarkeit betrifft, so sind zwei Fälle möglich. Man kann ein zur Untersuchung vorliegendes verdünntes Serum mittels einer bekannten Bakterienart auf die Gegenwart des gegen diese ausgebildeten Immunkörpers prüfen. Findet Agglutination statt, so ist dies ein Beweis dafür, daß der Organismus schon einmal mit der nämlichen Bakterienart in Berührung gekommen ist und normale Blutprotease auf die Verdauung dieses Erregers eingestellt hat. Ob es sich dabei um eine aktuelle oder um eine schon überstandene Infektion handelt, kann allerdings auf Grund der Serumuntersuchung allein ohne die Kontrolle der Klinik nicht entschieden werden. Dies zeigt am deutlichsten der Umstand, daß 70 % der Sera aller Erwachsenen mit Tuberkelbazillen agglutinieren, wovon glücklicherweise der kleinere Teil auf eine manifeste, der größere dagegen auf eine überwundene Tuberkuloseinfektion zurückzuführen ist.

¹⁾ Weil, *Biochem. Zeitschr.* 33 (1911) 56.

²⁾ Landsteiner u. Prašek, *Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap.*, I. Teil 10 (1911) 68.

Andererseits berechtigt ein negativer Befund ebenfalls nur bedingt zu diagnostischen Schlüssen; denn der Antikörper braucht eine gewisse Zeit zu seiner Entwicklung und gerade dort, wo sein Nachweis am meisten in Betracht kommt, bei der Typhusdiagnose, kann es vorkommen, daß dieser letztere erst im Rekonvaleszenzstadium gelingt, oder daß der Patient vor Ausbildung des Antikörpers der Infektion erliegt. Doch ist ein positiver Serumbefund, verbunden mit der klinischen Beobachtung, bei Typhus und Paratyphus beweisend.

Je nachdem das fragliche Serum mit einer Typhus- oder einer Paratyphuskultur bei höheren Verdünnungen agglutiniert, stammt das Patientenserum von einem an Typhus oder an Paratyphus Erkrankten. Schon die geringe Verschiedenheit der Bakterienleibessubstanz der beiden nahe verwandten Erreger findet also in einem verschiedenen starken Ausfall bzw. in einer bei ungleicher Verdünnung eintretenden Reaktion des agglutinierenden Immunsperms seinen Ausdruck. Ganz allgemein tritt diese sog. Verwandtschafts- oder Gruppenreaktion um so schwächer auf, je ferner die Bakterieneiweiße einander stehen. Agglutiniert z. B. ein Typhusserum mit Typhusbazillen in einer Verdünnung 1:1500, so muß zur Agglutination von Paratyphusbazillen eine etwa 5fach so hohe Konzentration angewandt werden und die im System noch ferner stehenden, aber immer noch deutlich verwandten Kolibazillen bedürfen gar eines Heraufgehens der Serumkonzentration auf 1:40. Der Ausfall der Verwandtschaftsreaktion bringt demnach die phylogenetischen Beziehungen in markantester Weise zum Ausdruck. Zugleich stellt dies den inneren Zusammenhang her zwischen den normalen, gegen alle Bakterien usw. in gleicher Weise gerichteten und den spezifischen humoralen Proteasen (bzw. für die vorliegende Aeußerung dieser Proteasen der normalen und der spezifischen „Agglutinine“).

Die von Gruber und Vidal für die Typhusdiagnose in Vorschlag gebrachte Agglutinationsprobe wird in den verschiedenartigsten Modifikationen ausgeführt. Sehr gut bewährt sich z. B. das am Freiburger Bakteriologischen Universitäts- und kantonalen Untersuchungslaboratorium (Prof. Glücksmann) seit langem eingeführte Verfahren. Nach diesem beschickt man eine Anzahl völlig reiner und trockener Reagenzgläser mit je 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung, fügt zu einem derselben $\frac{1}{10}$ ccm des typhusverdächtigen Serums und bringt den Inhalt des Reagenzglases durch weiteren Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung auf 2,5 ccm. Man erhält so die Stammverdünnung von $\frac{1}{25}$. Von dieser Lösung bringt man 1 ccm in ein zweites Reagenz-

glas, so daß man nunmehr in diesem (da 1 ccm Kochsalzlösung schon vorhanden ist) die Verdünnung $\frac{1}{50}$ erhält. Aus diesem stellt man sich in derselben Weise die Verdünnung $\frac{1}{100}$, von diesem wieder die Verdünnung $\frac{1}{200}$ und weiter $\frac{1}{400}$, $\frac{1}{800}$, $\frac{1}{1600}$ und event. noch Zwischenverdünnungen $\frac{1}{600}$, $\frac{1}{1000}$, $\frac{1}{1200}$, $\frac{1}{1400}$ her. Dann verreibt man in jedem Reagenzglas sowie außerdem in einer Kontrolle von 1 ccm reiner physiologischer Kochsalzlösung je eine Oese einer Typhuskultur und überläßt die Mischung 1—3 Stunden sich selbst bei Bruttemperatur, nachdem zuvor noch durch Entfernung des Flüssigkeitsüberschusses im ersten und letzten Gläschen das gleiche Volumen in sämtlichen Proben hergestellt worden ist. Zur Unterscheidung von Paratyphus B prüft man gleichzeitig in derselben Weise gegen diesen Bazillus. Man verreibt also an Stelle der Typhuskultur je eine Oese Paratyphuskultur mit dem fraglichen Serum und sieht zu, ob das Serum bei höheren Verdünnungen mit der Typhus- oder mit der Paratyphuskultur Agglutination zeigt. Das Verfahren kann dadurch noch empfindlicher gestaltet werden, daß man die Agglutination an herausgenommenen Proben der verschiedenen Verdünnungen mikroskopisch im hängenden Tropfen verfolgt. Die Erscheinung wird durch dieses optische Hilfsmittel begreiflicherweise früher und bei höheren Verdünnungen sichtbar, als bei makroskopischer Beobachtung.

Wichtige Dienste leistet die Agglutination auch bei der Dysenterie zur Entscheidung, ob es sich um eine Infektion mit dem durch Antitoxin erfolgreich zu bekämpfenden Bazillus Shiga-Kruse oder um eine solche mit dem Bazillus Flexner handelt.

Die Anwendung der Agglutinationsprobe zur Untersuchung fraglicher Bakterienstämme mit bekannten Sera. Außer der Verfolgung der agglutinierenden Reaktion zwischen einem unbekannten Serum und einem bekannten Bakterienstamm findet auch der zweite, umgekehrte Fall, die Prüfung eines unbekannten, resp. verdächtigen Bakterienstamms an einem bekannten Serum zu diagnostischen Zwecken Verwendung.

Namentlich für die nur auf diesem Wege einwandfreie Identifizierung des Choleraerregers bedient man sich der Agglutination, indem man die choleraverdächtigen Vibrionen aus dem Darm der Patienten auf Agar züchtet und je eine Oese der Kultur mit je 1 ccm Immunserumverdünnungen von 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 und reiner physiologischer Kochsalzlösung als Kontrolle verreibt. Außerdem werden gleichzeitig als weitere Kontrollen eine Oese der zu prüfenden Kultur mit 1 ccm Normalserum und

eine Oese einer sicheren Cholerakultur mit 1 ccm des Immunserums angesetzt.

Das Immunserum erhält man in der Weise, daß man in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte, durch Temperaturerhöhung auf 60° oder durch Behandeln mit 1/2%iger Karbolsäure abgetötete Cholerakulturen einem Kaninchen in steigenden Dosen in 5—6 Tagen einspritzt. Nachdem man an einer aus der Ohrvene entnommenen Probe das Serum hochwertig genug befunden hat, wird das Tier entblutet¹⁾.

Bakteriolyse und Bakteriozidie.

Nach Besprechung der Methoden, die sich auf die Wirkung des komplementlosen Immunkörpers gründen, wollen wir uns denjenigen zuwenden, die Ambozeptor und Komplement²⁾ zu ihrem Gelingen benötigen. In erster Linie ist es die Bakteriolyse und die damit einhergehende Bakteriozidie, deren diagnostische Bedeutung in Betracht zu ziehen ist.

Wie bei der Agglutination kann es sich hierbei sowohl um die Identifizierung eines fraglichen Bakterienstamms wie um die Identifizierung eines Immunserums handeln, und zwar kommen zwei Methoden, diejenige von Pfeiffer und das Plattenverfahren, in Anwendung. Bei dem Pfeifferschen Versuch, dessen man sich neben der Agglutinationsmethode zur Erkennung eines choleraverdächtigen Bakterienstamms bedient, wird das erforderliche Immunserum in der schon beschriebenen Weise durch Einspritzung abgetöteter Cholerakulturen vom Kaninchen gewonnen. 0,0002 ccm dieses Serums sollen die Fähigkeit besitzen, eine Oese einer 18stündigen Cholerakultur in der Meerschweinchenbauchhöhle in einer Stunde aufzulösen.

Man verfährt nun so, daß man einem Meerschweinchen eine Oese der verdächtigen Kultur, in 1 ccm Bouillon aufgeschwemmt, sowie 0,001 ccm Choleraimmunserum einspritzt. Diese Quantität Immunserum entspricht also der 5fachen Schutzdosis.

Ein zweites Meerschweinchen erhält statt dessen 0,002 ccm des Immunserums, d. i. die 10fache Schutzdosis.

Einem dritten Tier wird ebenfalls eine Oese der Kultur eingegeben. Statt des Immunserums werden ihm jedoch 0,01 ccm Normal-

¹⁾ Siehe Much, Immunitätswissensch. loc. cit. Fußnote 2, S. 337.

²⁾ H. Braun, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 9 (1911) 665; siehe auch Derselbe, Biochem. Zeitschr. 31 (1911) 65, hat darauf hingewiesen, daß der bakterizide Komplementeinfluß an das Zusammenwirken zweier Serumbestandteile gebunden ist, deren einer der Globulinfraktion, der andere dem übrigen Serum zukommt.

serum gegeben. Ein viertes Tier erhält zur Kontrolle der Virulenz der betreffenden Kultur $\frac{1}{10}$ Oese in 1 ccm Bouillon.

Nach der Einspritzung entnimmt man den Tieren nach 0, 10, 20, 30 und 60 Minuten mittels feiner Kapillarpipetten Exsudat aus der Bauchhöhle und prüft dasselbe im hängenden Tropfen.

Das erste Tier zeigt nach 10 Minuten viele Granula neben unbeweglichen aber noch lebenden Bakterien; nach einer Stunde sind Bakterien und Granula verschwunden, das Tier überlebt.

Das zweite Meerschweinchen zeigt schon nach einer halben Stunde so gut wie keine Granula mehr und bleibt ebenfalls am Leben; das dritte Tier dagegen zeigt nach 10 Minuten viele Granula und viele bewegliche Bakterien; nach einer Stunde sind die Granula verschwunden, die Bakterien dagegen sind in großer Menge vorhanden. Das Tier stirbt, da die normalen Bakteriozidine zur Auflösung der Erreger nicht ausreichen.

Ebenso stirbt auch das vierte Tier, das nach 10 Minuten sehr wenig Granula neben vielen Stäbchen und nach einer Stunde eine Unmasse Stäbchen aufweist.

Bei der Austitrierung eines bakteriolytischen Krankenserums oder eines künstlichen Immunserums zum Zweck einer quantitativen Ermittlung des lytischen Immunkörpers verfährt man prinzipiell gleich; doch wird die mit einer Oese Kultur gemischte Serummenge abgestuft.

Ueberlebt das Tier, das z. B. 0,0001 ccm Immunserum erhalten hat, während ein Meerschweinchen, das nur 0,00005 ccm des lytischen Antiserums bekommt, zugrunde geht, so liegt der Titer des Serums zwischen 0,0001 und 0,00005 ccm.

Nach dem Plattenverfahren wird in dem zur Untersuchung vorliegenden Serum das Komplement durch Erhitzen auf 56° zerstört. Je 1 ccm verschiedener Serumverdünnungen werden dann mit 0,1 ccm einer 10 000fach verdünnten Bouillonkultur vermischt und 0,05 ccm frisches Kaninchenserum zur Lieferung des Komplements zugesetzt. Nach z. B. 5stündigem Verweilen im Brutschrank wird ein bestimmtes Quantum zu Agarplatten verarbeitet. Nach 24 Stunden werden die auf den Agarplatten vorhandenen Keime ausgezählt und verglichen mit dem Befund bei gleichzeitig angesetzten Röhrchen, deren eines nur Komplement und Kultur, ein anderes nur Immunserum in der größten Konzentration aber ohne Komplement, und ein drittes nur Kultur enthält. Das letztere wird sofort zu Agarplatten verarbeitet, um die ursprüngliche Keimzahl festzustellen. Zur Kontrolle wird weiter ein Normalserum in genau gleicher Weise behandelt wie das

Immunserum. Auch bei diesem Versuch tritt ein Optimum zutage. Die starken Konzentrationen wirken ebenso wie die ganz schwachen nur in geringem Maße abtötend.

Physikalisch-chemische Reaktionen auf den lytischen Immunkörper.

Wie die proteolytische Wirkung des Immunkörpers gegenüber lebenden Erregern biologisch in der Bakteriozidie zutage tritt, so verrät sich dieselbe auch durch physikalisch-chemische Aenderungen, z. B. nach Weichardt wenigstens bei totem Eiweiß in einer mit der Aufspaltung einhergehenden Diffusionsbeschleunigung und in dem von Abderhalden festgestellten, a. a. O. eingehend besprochenen veränderten optischen Verhalten. Ebenso sollte man, wie bei der Pepsinverdauung, eine Verminderung der Viskosität eines aufspaltbaren Substrats in Gegenwart seines spezifischen Immunkörpers erwarten. Weder die Diffusionsbeschleunigung noch die bisher nicht berücksichtigte Viskositätsänderung haben aber in die Praxis des Immunkörpernachweises Eingang gefunden.

Die Meistagminreaktion. Dagegen wird die von Ascoli und Izar festgestellte Tatsache praktisch verwertet, daß bei Gegenwart des Immunkörpers eine Erniedrigung der Oberflächenspannung einer Erregermaterial enthaltenden Lösung stattfindet. Um diese nach Weil und Spät¹⁾ mit der Veränderung der kolloiden Teilchen²⁾ zusammenhängende Aenderung und damit den Antikörpergehalt zu messen, haben Ascoli und Izar die Zunahme der Tropfenzahl mit Hilfe des Traubeschen Stalagmometers ermittelt³⁾. Man erhält also z. B. bei einer Mischung von Typhusbazillenextrakt mit typhösem Serum infolge eines Gehaltes an lytischem Immunkörper eine höhere Tropfenzahl als bei der entsprechenden Mischung mit Normalserum. Da die Methode nur unzureichend aufgeklärt ist und viel Übung verlangt, so kann dieselbe in der Praxis hier wie bei anderen bakteriellen Erkrankungen nicht mit den übrigen Verfahren zur Bestimmung des lytischen Antikörpers konkurrieren. Dagegen scheint sie auf einem Gebiet heimisch zu werden, wo die meisten anderen Immunkörperreaktionen, vielleicht infolge des hemmenden Antitrypsins, nicht zum Ziele führen, — bei der Serumdiagnose der malignen Tumoren.

¹⁾ Weil u. Spät, Biochem. Zeitschr. 33 (1911) 63.

²⁾ Die genannten Forscher machen die physikalische Beschaffenheit für eine spezifische Bindungsfähigkeit verantwortlich.

³⁾ Ascoli, Münchner med. Wochenschr. 57 (1910) 62.

Gerade dieses Versagen der anderen Reaktionen, der mangelnde Parallelismus zwischen diesen und der Meistagminreaktion, auf welchen Fukuhara ¹⁾ mit besonderer Berücksichtigung der Präzipitinprobe und der Anaphylaxie hingewiesen hat, verbunden mit dem Umstand, daß das Tumorextrakt auch durch ein Extrakt aus Rinderpankreas ersetzt werden kann, legt den Gedanken nahe, daß wir in diesem Fall mit Hilfe der Meistagminreaktion etwas ganz anderes nachweisen, als den spezifischen Immunkörper gegen Tumoreiweiß.

Schon Much ²⁾ hat dies in Betracht gezogen und hält eine Verwandtschaft der hier vorliegenden Verhältnisse mit denjenigen bei der Wassermannschen Reaktion für möglich. Ja, J. Traube ³⁾ hat sogar neuerdings die Ansicht vertreten, daß die Meistagminreaktion lediglich ein Maß sei für die Alkalinität der Sera. Mir scheint es nicht unwahrscheinlich zu sein, daß bei der Meistagminreaktion auf ein echtes, lytisches Prinzip geprüft wird, jedoch nicht auf einen im Menschenserum ausgebildeten, gegen Tumoreiweiß eingestellten Immunkörper, da sich ja gerade das Serum Karzinomkranker vom normalen durch das fehlende Tumorauf Lösungsvermögen unterscheidet ⁴⁾, sondern umgekehrt auf das Korpereiweiß spaltende Lysin, mit Hilfe dessen die Tumorzellen ihre Verheerungen im Organismus anrichten. Da dasselbe den Charakter des gewöhnlichen unspezifischen Trypsins besitzt, wie dies auch aus dem Vorhandensein von Antitrypsin im Blut Karzinomatöser hervorgeht, so ist durchaus verständlich, daß man an Stelle des tryptisch wirkenden Tumorextrakts ein in gleicher Weise hergestelltes Rinderpankreasextrakt ⁵⁾ verwenden kann.

¹⁾ Fukuhara, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap. 9 (1911) 288.

²⁾ Much, Immunitätswissensch., Würzburg 1911, S. 180, 181.

³⁾ J. Traube, Münch. med. Wochenschr. (1914) 1713.

⁴⁾ Freund hat diesen Umstand für die Karzinomdiagnose herangezogen. Man stellt sich einen Geschwulstzellenbrei in der Weise her, daß man einen Tumor von Lebenden oder Toten zerkleinert, mit 1%iger Natriumbiphosphoricumlösung behandelt, durch Gaze hindurchpreßt, nach dem Absetzen mit 0,6%iger Kochsalzlösung wäscht, von neuem absetzen läßt und 1%ige, zuvor neutralisierte Fluornatriumlösung hinzufügt. Die Zellaufschwemmung soll pro Quadrat der Thoma-Zeißschen Zählkammer 20 Zellen enthalten. Ein Tropfen dieser Aufschwemmung wird dann mit zehn Tropfen eines vorher mit $\frac{1}{10}$ seines Volumens mit 5%iger Fluornatriumlösung versetzten Serums und einem Tropfen 5%iger Fluornatriumlösung vermischt und 24 Stunden bei 40° belassen. Die Mischung mit Normalserum zeigt danach eine Aufhellung und bei der Auszählung der Zellen eine Verminderung, während ein Karzinomserum keine derartige Veränderung zeigt.

⁵⁾ Der gut zerkleinerte Tumor oder das Rinderpankreas werden getrocknet,

Die Meistagminreaktion wird in der Weise ausgeführt, daß man zunächst vor jedem Versuch das Extrakt austitriert, indem man je 1 ccm verschiedener mit Wasser hergestellter Extraktverdünnungen mit 9 ccm einer (mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellten) Normalserumverdünnung von 1:20 vermischt und die Tropfenzahl nach 2stündigem Verweilen der Mischungen bei Bruttemperatur am Stalagmometer ermittelt.

Als Testdosis dient dann die Extraktverdünnung, die von der gleichzeitig mit 1 ccm Wasser und 9 ccm Normalserum angestellten Kontrollprobe um $\frac{3}{10}$ — $\frac{5}{10}$ eines Tropfens abweicht. Hat man sich durch Prüfung dieser Testdosis an mehreren karzinomatösen und normalen Seris von der Wirkungsfähigkeit des Extrakts überzeugt, so wird es für den definitiven Versuch verwendet, wobei die Mischungen mit reinem Wasser untereinander mittels des Stalagmometers verglichen werden. Das Gemisch von 9 ccm Krankenserum 1:20 mit 1 ccm der Testextraktverdünnung zeigt dann, wenn ein maligner Tumor vorliegt, eine höhere Tropfenzahl als die entsprechenden Gemische Normalserum 1:20 plus Extrakt, Normalserum 1:20 plus H_2O und Tumorerum 1:20 plus H_2O . Zwischen dem Normalserum-Extrakt- und dem Normalserum-Wasser-Gemisch besteht dagegen kein wesentlicher Unterschied.

Die indirekten Nachweismethoden des lytischen Immunkörpers.

Verfolgten wir bei den vier bisher besprochenen Reaktionen des spezifischen Lysins dessen Wirkung gegenüber artfremdem Eiweiß direkt, sei es wie bei Agglutination und Präzipitation an der ersten Spaltungsphase oder an der tiefer greifenden, die nur in Gegenwart von Ambozeptor und Komplement verläuft, so sind demgegenüber die nunmehr zu besprechenden Nachweisverfahren indirekte, indem die stattgefundene oder stattfindende Spaltung des geformten Eiweißes an der Reaktion mit einem eingeschalteten zweiten System erkannt wird.

Der Organismus als Ganzes antwortet auf die parenterale Eiweißverdauung, welche unter dem Einfluß des lytischen Immunkörpers vor sich geht, mit der Ueberempfindlichkeitsreaktion, die im wesentlichen als eine Albumose- bzw. Peptonvergiftung oder, allgemeiner gefaßt, als eine Vergiftung durch die entstandenen Spaltprodukte der Bakterienleibessubstanz aufzufassen ist (Wolff-Eisner, H. Pfeif-

mit der vierfachen Methylalkoholmenge während 24 Stunden bei 50° extrahiert und zweimal heiß durch ein gehärtetes Filter filtriert.

fer¹⁾ u. a.)²⁾. Für die allgemeinere Fassung spricht, daß zwischen dem natürlichen anaphylaktischen Schock und dem Peptonschock, wie z. B. Manwaring³⁾ und Loewit⁴⁾ gezeigt haben, Unterschiede bestehen⁵⁾, die möglicherweise eben dadurch verursacht sein könnten, daß die Wirkung von Albumosen und Peptonen durch andere Spaltprodukte eine Modifikation erleidet. Heyde⁶⁾ hat zwar aus seinen Untersuchungen über den Verbrennungstod und seine Beziehungen zum anaphylaktischen Schock den Schluß gezogen, daß der letztere überhaupt nicht durch Albumosen oder Peptone, sondern durch Methylguanidin bedingt sei, das überall, wo Eiweiß autolytisch zerfällt, vorhanden ist. Doch ist da-

¹⁾ H. Pfeiffer, Das Problem der Eiweißanaphylaxie, Jena 1910; Derselbe u. Mita, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 6 (1910) 18, 727; Pfeiffer, Ebenda 10 (1911) 550; Hertle u. Pfeiffer, Ebenda 10 (1911) 541, 16 (1912) 38; Wiener klin. Wochenschr. 24 (1911) 573; Mitteil. des Vereins der Aerzte in Steiermark (1912) Nr. 8.

²⁾ Weichardt, Münchner med. Wochenschr. (1901) Nr. 52; Deutsche med. Wochenschr. (1902) Nr. 35; Hygien. Rundschau (1903) Nr. 10; Jahresber. üb. d. Ergebn. d. Immunitätsforsch., Stuttgart von 1906 an; Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffw. [N. F.] 5 (1910) 131; Oppenheimer, Hofmeisters Beitr. 4 (1903) 263; Friedemann u. Isaac, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 1 (1905) 513, 3 (1906) 209, 4 (1907) 830; Heilner, Zeitschr. f. Biol. 50 (1907/08) 26, 476; Münchner med. Wochenschr. (1908) Nr. 49; Lommel, Verhandl. d. Kongr. f. innere Medizin 24 (1907) 290; Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 58 (1908) 50; Michaelis u. Rona, Archiv f. d. ges. Physiol. 71 (1908) 163, 73 (1908) 406, 74 (1908) 578; v. Körösy, Zeitschr. f. physiol. Chem. 62 (1909) 76, 69 (1909) 313, Bloch u. Massini, Zeitschr. f. Hygiene 63 (1909) 68; Salus, Med. Klinik (1909) Nr. 14; Rößle, Fortschritte der Cytotoxinforschung, Wiesbaden 1910; Moro, Experimentelle u. klin. Ueberempfindlichkeit (Anaphylaxie), Wiesbaden 1910; Edgar Zunz, A propos de l'anaphylaxie, Bruxelles 1911; Schittenhelm, Ueber Anaphylaxie vom Standpunkt der Pathol., Physiol. u. d. Klinik, Jahresber. üb. d. Ergebn. d. Immunitätsforsch., Stuttgart 1910; Biedl u. Kraus, Zentralbl. f. Physiol. 24 (1910) 258; Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 10 (1911) 711; Seitz, Ebenda 11 (1911) 588; F. Schenk, Wiener klin. Wochenschr. 24 (1911) 521; Joachimoglu, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap. 8 (1911) 452; Kammann, Ebenda 11 (1911) 659; Kapsenberg, Ebenda 12 (1912) 477; Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 81 (1912) 285, 82 (1912) 109; Schlecht, Ueber experim. Eosinophilie nach parenteraler Zufuhr artfremden Eiweißes und über die Beziehungen der Eosinophilie zur Anaphylaxie, Leipzig 1912.

³⁾ Manwaring, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap. 8 (1911) 589.

⁴⁾ Loewit, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 65 (1911) 337.

⁵⁾ Auch mit synthetischen Polypeptiden konnten Abderhalden u. Kämpf, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71 (1911) 421, keinen typischen anaphylaktischen Schock auslösen.

⁶⁾ Heyde, Zentralbl. f. Physiol. 25 (1911) 441.

mit ein Beweis gegen die Albumose-Peptonnatur der im allgemeinen die Anaphylaxie verursachenden Stoffe nicht erbracht.

(Noch abweichender ist die Annahme von Turro u. Gonzaley¹⁾, wonach das von diesen Forschern aus Globulinen erhaltene dialysierbare und thermostabile anaphylaktische Gift ein Alkaloid wäre.)

Die Leukozyten nehmen die durch den proteolytischen Einfluß des Immunkörpers getöteten oder in ihrer Vitalität herabgesetzten und damit für die Phagozytose vorbereiteten Bakterien in sich auf, und diese Folgewirkung wird als Oponinreaktion bezeichnet.

Bei der Komplementbindungsreaktion endlich wird bei einem anderen lytischen Vorgang — in Praxi nur der Hämolyse — Ausbleiben konstatiert, wenn das für seinen Ablauf notwendige Komplement von dem gleichzeitig anwesenden System: lytischer Immunkörper + Bakterien für die eigene Spaltung mit Beschlag belegt worden ist.

Die Ueberempfindlichkeitsreaktion (Anaphylaxie), ihre Theorie und ihre Anwendungen. Von den indirekten Nachweismethoden des lytischen Immunkörpers ist die Ueberempfindlichkeitsreaktion die empfindlichste und auch den direkten Methoden ist sie in dieser Hinsicht überlegen. Zugleich ist sie der allgemeinsten Anwendbarkeit fähig; denn pathogene und nicht pathogene lebende Mikroben und geformtes sowie ungeformtes artfremdes Eiweiß verschiedenster Herkunft und Beschaffenheit²⁾, unter Umständen auch lipoidartige Stoffe, wie bei den Tuberkelbazillen, und hochkomplizierte Neutralfette von der Art des Nastins des Leprabazillus³⁾ erfahren in und außerhalb des Organismus eine Aufspaltung, als deren Folge die die Ueberempfindlichkeit auslösenden Stoffe auftreten. Anfangs ist es nur das normale, humorale, proteolytische Enzym, welches den, man möchte sagen deplacierten, Verdauungsvorgang beherrscht. Die Geschwindigkeit des von beiden Faktoren, von der Enzym- wie von der Substratmenge, abhängigen Aufspaltungsvorgangs ist dann so langsam, daß der Organismus reaktionslos oder fast reaktionslos mit

¹⁾ Turro u. Gonzaley, Zeitschrift f. Immunitätsforschung u. experim. Therap., I. Teil 9 (1911) 556.

²⁾ Siehe z. B. Friedberger u. Mita, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I Teil 10 (1911) 216, 362, 457.

³⁾ Bei diesen fettartigen Stoffen ist die Ursache der Ueberempfindlichkeit offenbar nicht ein proteolytisches Enzym, sondern ein gegen dieselben ausgebildeter lipolytischer Immunkörper, der durch spezifische Anpassung der Serolipase entstehen würde.

den allmählich in Freiheit gesetzten Verdauungsprodukten fertig wird. Daß solche Produkte auch unter dem Einfluß der Protease des normalen Serums gebildet werden, zeigen z. B. die Versuche von Friedberger und Nathan¹⁾, welche Forscher beim Vermischen von Serum mit Eiweiß — und selbst bei Verwendung von artgleichem Serum als Antigen — im Reagenzglas Anaphylatoxin gewinnen konnten. Weichardt und Friedberger zeigten ferner, daß dadurch, daß man Tuberkelbazillen oder auch harmlose Hefezellen während 24 Stunden der verdauenden Wirkung normalen Meerschweinchenserums überläßt, so viel Ueberempfindlichkeitsstoff erzeugt wird, daß ein Meerschweinchen, welchem nach dieser Zeit das abzentrifugierte Serum eingespritzt wird, unter den Erscheinungen der Ueberempfindlichkeit zugrunde geht. Nicht anders zu deuten ist der Befund von Moro und Tomono²⁾, daß Tuberkulosepräzipitate in Berührung mit Meerschweinchenkomplement akut anaphylaktisch wirkende Stoffe ergeben. Denn das Meerschweinchenkomplement dürfte als die normale Blutprotease (eventuell auch Lipase)³⁾ dieser Tiere betrachtet werden, die sich offenbar vor derjenigen anderer Tiere durch eine besonders kräftige spaltende Wirkung auszeichnet.

Man kann als Stützen dieser Auffassung anführen: 1. daß das Meerschweinchenserum das einzige normale Serum ist, welches auch bei der offenbar gegenüber den biologischen Verfahren weniger empfindlichen chemischen Prüfung auf Eiweißabbauprodukte, nach den im Abschnitt über die Abwehrfermente beschriebenen Methoden von Abderhalden, positive Reaktionen ergibt; 2. den empirisch ermittelten Kunstgriff, z. B. bei der Komplementbindungsreaktion⁴⁾ in dem zu prüfenden Serum das eigene Komplement durch Hitzewirkung zu zerstören und hierauf durch das viel wirksamere Meerschweinchenkomplement zu ersetzen.

Auch könnte man, entsprechend der hier vertretenen Auffassung, daß bei der Wirkung von Diphtherie- und Tetanustoxin, sowie Kobragift proteolytische oder lipolytische Vorgänge im Spiele sind — eine Auffassung, die sich übrigens für das Diphtheriegift mit derjenigen

¹⁾ Friedberger u. Nathan, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 9 (1911) 567.

²⁾ Moro u. Tomono, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap. 9 (1911) 583.

³⁾ Siehe das Lipasekapitel im folgenden.

⁴⁾ Siehe im folgenden.

von Roux und Yersin¹⁾, sowie Löffler²⁾ deckt³⁾ —, den beschleunigenden Einfluß, welchen das Meerschweinchenkomplement auf diese Giftwirkungen ausübt⁴⁾, mit seiner eigenen fermentativen Tätigkeit in Zusammenhang bringen, z. B. vergleichbar der Begünstigung der Trypsinwirkung durch Erepsin. Da Enzyme auch eine zerstörende Wirkung aufeinander ausüben können (Pepsin-Trypsin), so bedeutet es keinen Widerspruch mit dem soeben Ausgeführten, daß Braun⁵⁾ und Omorokow⁶⁾ bei der Vermischung absteigender Mengen Meerschweinchenserum mit Kobragift bei den größten Serum-mengen ein Ausbleiben der Hämolyse nachträglich zugesetzter Blutkörperchen feststellen konnten.

Daß die Identifizierung des Komplements — dessen Wirkung auch Mc Kendrick⁷⁾ als eine lytische betrachtet — mit einem hydrolysierenden Ferment seine Berechtigung hat, geht ferner aus den Versuchen von Liefmann und Cohn⁸⁾ hervor, welche bei der Wirkung des Komplements auf die ambozeptorbeladenen Blutkörperchen einen so minimen und noch dazu in der Hauptsache durch Nebenreaktionen bedingten Verbrauch des Komplements feststellten, daß sie diese Beobachtung nur durch einen Enzymcharakter des Komplements deuten konnten. Die Beschleunigung, welche die Hämolyse wie auch die Agglutination ambozeptorbeladener Blutkörperchen durch Meerschweinchenkomplement in Gegenwart von normalem Kaninchenserum⁹⁾ und normalem Schweineserum¹⁰⁾ erfährt, könnte daher ganz analog der erwähnten Verstärkung proteolytisch und lipolytisch wirkender Toxine durch Komplement als eine Verstärkung

¹⁾ Roux u. Yersin, Ann. Inst. Pasteur (1888) Nr. 12.

²⁾ Löffler, Deutsche med. Wochenschr. (1890) Nr. 5 u. 6.

³⁾ Demgegenüber sei die Annahme von Brieger u. Fränkel, Berliner klin. Wochenschr. (1890) Nr. 11, erwähnt, daß das Diphtheriegift als ein Toxalbumin zu betrachten sei.

⁴⁾ Dold u. Ungermann, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap. I. Teil 11 (1911) 86.

⁵⁾ Braun, Biochem. Zeitschr. 31 (1911) 65.

⁶⁾ Omorokow, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 10 (1911) 285.

⁷⁾ Mc Kendrick, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 83 (1911) 493.

⁸⁾ Liefmann u. Cohn, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 8 (1910) 58.

⁹⁾ Friedberger u. Moreschi, Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde, I. Abteil. 45, 446; Altmann, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 8 (1910) 24.

¹⁰⁾ Fränkel, Ebenda, I. Teil 8 (1910) 781, 10 (1911) 383.

durch die gleichsinnige Wirkung zweier Proteasen (oder Lipasen) aufgefaßt werden.

Daß das Komplement das wirksame Agens dieser Sera ist, kann aus der Zerstörung oder Abschwächung des letzteren im Kaninchen- wie Schweineserum durch halbstündiges Erhitzen auf 56° geschlossen werden. Dieselbe Inaktivierungstemperatur fanden Vaughan u. Wright¹⁾, auch bei ihren Sensibilisierungsversuchen mit Eiweiß für ein im Serum entstandenes Enzym.

Um der an sie herangetretenen unvorhergesehenen Aufgabe besser gerecht werden zu können, geht bei der Berührung mit fremdem Eiweiß mit der humoralen Blutprotease die Veränderung vor sich, die in einer Anpassung des Ambozeptors an das neue Substrat besteht. Aus dem unspezifischen humoralen proteolytischen Enzym wird ein spezifisches, indem der Organismus die vorhandenen Anlagen immer zu solchen Fermenten umbildet, die er braucht. Kommt er nun zum zweiten Male mit dem nämlichen Eiweiß in Berührung, gegenüber welchem er in der angegebenen Weise ein Ferment erworben hat, so ist er der ihm aufgebürdeten neuen verdauenden Funktion infolge der stattgefundenen Anpassung weit besser gewachsen. Die parenterale Verdauung verläuft daher unvergleichlich viel rascher als das erste Mal. Infolge dieser für die Ueberempfindlichkeit charakteristischen Reaktionsbeschleunigung wird der Organismus mit den giftigen Eiweißspaltprodukten überschwemmt, auf welche er schon bei der Einverleibung kleinster Eiweißmengen mit Temperatursteigerung und Lokalreaktionen an der Einstichstelle und bei größeren Dosen und intravenöser Einspritzung des betreffenden Eiweißes mit Krämpfen und Atemnot, die sogar zum Tode führen können, reagiert.

Dadurch daß Wolff-Eisner mit genialem Griff die Identität des Ueberempfindlichkeit erzeugenden lytischen Prinzips mit dem bakteriziden bzw. bakteriolytischen Immunkörper postuliert hat, ist die Bedeutung dieser Erscheinung in helles Licht gerückt worden. Hierdurch findet die Zweischneidigkeit der durch Immunisierung gesteigerten Bakteriozidie — die Beobachtung, daß ein gegen einen bestimmten Erreger immunisiertes Tier bei Behandlung mit demselben unter Umständen rascher zugrunde geht als ein nicht immunisiertes — eine glatte Erklärung; dies namentlich in Verbindung mit der Annahme, daß beim Abbau pathogener, zur Gruppe der Endotoxinbakterien gehöriger Mikroorganismen außer den gewöhnlichen Albumosen und Peptonen noch besonders giftige Eiweißspaltprodukte auftreten können.

¹⁾ Vaughan u. Wright, Zeitschr. f. Immunitätsforschung u. experim. Therap., I. Teil 11 (1911) 673.

Durch deren Gegenwart wird dann das typische Krankheitsbild einer bestimmten Endotoxinbakterieninfektion ausgelöst.

Die enorme Beschleunigung des Eintritts und die Verstärkung der Reaktion, welche v. Pirquet¹⁾ bei der Revakzination beobachtet hat, sind nach Much²⁾ ebenfalls als Ueberempfindlichkeitserscheinungen zu deuten. Vor allem aber gehört hierher die Tuberkulinreaktion, mit deren Hilfe eine irgend einmal stattgefundene Tuberkuloseinfektion bei einem Individuum festgestellt werden kann.

Eine Besprechung der verschiedenen Ausführungsarten dieser Reaktion und der Kautelen, unter denen sie, wie bei der quantitativen Methode von Ellermann und Erlandsen, für die Diagnose manifester Tuberkulose herangezogen werden kann, würde jedoch, da sie nur für den Kliniker und den Epidemiologen Interesse besitzt, über den Rahmen dieses Buches hinausgehen.

Der Kenntnis des Ueberempfindlichkeitsphänomens als solchen kann aber auch der Analytiker nicht entraten, seit Friedberger³⁾ darauf hingewiesen hat, daß keine Methode der Eiweißdifferenzierung weiter führt als sie. Er bedient sich dabei der Temperatursteigerung, welche schon durch Eiweißspuren bei Tieren hervorgerufen wird, die eine Vorbehandlung mit demselben Eiweiß erfahren haben. Da man in dieser Weise ungeformtes und geformtes Eiweiß nachweisen kann, so eignet sich die Methode sowohl für den gerichtlichen Chemiker zum Menschenblutnachweis und für den Nahrungsmittelchemiker zur Prüfung der Herkunft von Fleischwaren, z. B. zur Feststellung selbst des geringsten Pferdefleischzusatzes in Würsten, als auch für den Bakteriologen und Kliniker zur Identifizierung eines fraglichen Bakterienstammes und für den Biologen zur Entscheidung von Verwandtschaftsfragen. So reagieren die Ueberempfindlichkeitsstoffe, wie z. B. Wendelstadt und Toni Fellmer⁴⁾ bei ihren Immunisierungsversuchen mit Pflanzeneiweiß feststellten, nicht nur auf das zur Sensibilisierung benutzte Eiweiß, sondern auch auf dasjenige artverwandter Pflanzen⁵⁾.

¹⁾ v. Pirquet, Allergie, Berlin 1910.

²⁾ Much, Immunitätswissensch., Würzburg 1911, S. 96.

³⁾ Friedberger u. Mitarbeiter, loc. cit.; siehe auch Derselbe, Münchner med. Wochenschr. (1910) Nr. 50 u. 51; Deutsche med. Wochenschr. (1911) Nr. 11; Fortschritte d. deutschen Klinik 2 (1911) 619.

⁴⁾ Wendelstadt u. Toni Fellmer, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 8 (1910) 48; Toni Fellmer, Inaug.-Dissert., Bern.

⁵⁾ In ähnlicher Weise reagiert ein mit Rinderserum sensibilisiertes Tier auf Kolostruminjektionen und umgekehrt ein mit Kolostrum oder dem Serum

Damit ist die analytische Anwendbarkeit der Ueberempfindlichkeit noch nicht erschöpft, denn nicht nur ungeformtes und geformtes Eiweiß irgendwelcher Provenienz, sondern auch von dem letzteren abgesonderte Toxine sind imstande, Ueberempfindlichkeit auszulösen, und es kann daher dieser Umstand zur Identifizierung eines Toxins herangezogen werden, selbst wenn dasselbe nur in Spuren vorhanden ist. Denn wie Behring gezeigt hat, können z. B. mit Diphtherietoxin vorbehandelte Tiere noch auf den millionsten Teil einer für normale Individuen indifferenten Giftmenge aufs heftigste reagieren, und gerade diese Tatsache war die erste Entdeckung auf diesem Gebiet überhaupt.

Der von Behring hierfür gewählte treffende Ausdruck Ueberempfindlichkeit, der sich mit der von Richet später in Gebrauch gebrachten Bezeichnung Anaphylaxie deckt, wurde alsbald auf die anderen völlig analogen Erscheinungen übertragen. Mit dieser Analogie des ganzen Erscheinungskomplexes bei scheinbar so heterogenen Ursachen hat sich die Immunitätswissenschaft nicht zurechtfinden können, und auf dem Boden hergebrachter Anschauungen wird sich eine Lösung des Rätsels auch nicht finden lassen. Nun besteht aber gar keine Veranlassung, eine prinzipielle Verschiedenheit der die Ueberempfindlichkeit bedingenden Ursachen anzunehmen. Faßt man das Toxin selbst, entsprechend der hier vertretenen Auffassung¹⁾, als lytisches, verdauendes Enzym des Bakteriums gegenüber Körpereiweiß auf, so tritt in beiden Fällen ein analoges Prinzip in Aktion. Organismus und Bakterium kämpfen gegeneinander mit denselben Waffen, indem sie mittels ihres Lysins das gegnerische Eiweiß zu verdauen suchen. In beiden Fällen kann als Folge dieser verdauenden Wirkung Ueberempfindlichkeit ausgelöst werden, weil hier wie dort Eiweißspaltprodukte entstehen.

Mit der von mir an anderem Ort schon vertretenen Auffassung, daß solche hemmende Verdauungsprodukte als Antitoxine fungieren können, würde auch die eigenartige Beobachtung von Behring eine glatte Erklärung finden, wonach sich häufig gerade die toxinüberempfindlichen Tiere durch ein sehr antitoxinreiches Serum auszeichnen. Wie die Antitoxine, so sind die Ueberempfindlichkeitsstoffe passiv anaphylaktisch gemachter Tiere mit dem Serum übertrag-

fernerstehender Milch sensibilisiertes Tier auf Rinderserum. Doch kann man mit Rinderserum nicht gegen alle Kuhmilcharten sensibilisieren. Siehe hierüber F. Graetz, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 9 (1911) 677.

¹⁾ Siehe auch Woker, Probleme der katalytischen Forschung, Leipzig 1907.

bar. Auch besteht nach Friedberger u. Castelli¹⁾ Parallelismus zwischen der Uebertragungsfähigkeit des Serums für anaphylaktische Stoffe und seinem Präzipitiergehalt.

Bei der Toxinüberempfindlichkeit würde also nach dem vorigen der schon von Behring erkannte innere Zusammenhang mit der Immunität bestehen. Immerhin darf man sich nicht verhehlen, daß bei dieser Deutungsweise, bei welcher das Toxin die direkte Ursache der Ueberempfindlichkeit wäre, noch lange nicht alle Schwierigkeiten behoben sind. Woher kommt z. B. die stärkere Wirkung des Giftes bei der Reinjektion? Wieso kann sich das Toxin die für die Wirkungssteigerung erforderliche Anpassung an das Substrat, die Spezifität, aneignen, da, gerade umgekehrt wie bei der Erzeugung der Eiweißüberempfindlichkeit, nicht das Substrat, sondern das Enzym von außen in den Organismus gelangt? Und ferner, wenn die Ueberempfindlichkeitsstoffe, wie man demnach annehmen müßte, identisch mit den Antitoxinen wären, so müßten diese letzteren selbst albumoseartigen Charakter besitzen. Das fast fehlende Diffusionsvermögen der Antitoxine deutet aber eher auf höhermolekulare Eiweißkörper hin, vielleicht auf die ersten Spaltprodukte des lebenden Eiweißes.

Durch eine kleine Ergänzung der vorhin erörterten Auffassungsweise verschwinden jedoch diese Schwierigkeiten, und der innere Zusammenhang zwischen Toxin- und Eiweißüberempfindlichkeit wird zugleich noch augenfälliger. Nach dieser Modifikation würden wir daran festhalten, daß das Toxin im Organismus als lytisches, lebendes Eiweiß, oder in manchen Fällen auch lebenswichtige Fettstoffe (Lipoide usw.), verdauendes Prinzip fungiert. Die hierdurch auftretenden, hochmolekularen ersten Spaltungskörper, die als Endprodukte eines nur gerade dem betreffenden Toxin eigentümlichen Modus einer Spaltungsreaktion auftreten und die wir nach dem früher Gesagten als Antitoxine ansprechen möchten, stellen nun aber Stoffe dar, mit denen der Organismus normalerweise nicht in Berührung kommt. Diese der Merkmale der Artgleichheit durch den Toxineinfluß verlustig gegangenen Stoffe wirken demnach nicht anders als von außen zugeführtes, artfremdes Eiweiß. Der Organismus setzt daher humorales, sich allmählich spezifisch auf die Fremdkörper einstellendes Lysin gegen dieselben ins Feld, — verdauendes Enzym, an dessen Wirkung einmal die raschere oder langsamere Eliminierung der Antitoxine aus dem Körper, andererseits das Auftreten der durch

¹⁾ Friedberger u. Castelli, Zeitschr. f. Immunitätsforsch u. experim. Therap., I. Teil 6 (1910) 179, sowie J. L. Burckhardt, Ebenda 8 (1910) 87.

die tieferen albumoseartigen Spaltprodukte geknüpften Ueberempfindlichkeit gebunden ist.

Die Toxinüberempfindlichkeit würde sich danach in letzter Linie auf nichts anderes als auf eine Eiweißüberempfindlichkeit reduzieren lassen. Auch hier wäre der lytische Immunkörper das wirksame Agens, welches durch die erste Einführung von Toxin eine spezifische Einstellung gegenüber den entstandenen Abbauprodukten des lebendigen Eiweißes erlangt. Dadurch würden bei einer zweiten Toxinbehandlung die neugebildeten Verdauungsprodukte eine so rasche Weiterspaltung zu den Ueberempfindlichkeit erzeugenden Albumosen erleiden, daß der Organismus, welcher derselben nicht ebenso rasch Herr werden kann, mit heftigsten Reaktionen antwortet.

Diejenige Allgemeinreaktion, die dabei in jedem Fall beobachtet werden kann, ist die Temperatursteigerung. Sie folgt jeder Form der Einverleibung von fremdem Eiweiß in den Organismus und jeder Veränderung von körpereigenem Eiweiß, welche demselben den Stempel der Körperfremdheit aufdrückt. Sei es, daß bei Infektionskrankheiten aller Art lebendes Bakterienmaterial in den Körper hineingelangt oder daß es sich wie bei zahllosen Immunisierungsverfahren um abgetötetes oder abgeschwächtes Bakterienmaterial handelt, oder daß unter dem Einfluß der lytischen Stoffe, welche die Bakterien usw. absondern, aus den befallenen Geweben selbst angegriffenes, körpereigenes Eiweiß in die Blutbahn gelangt, oder daß artfremdes, mit der Nahrung aufgenommenes Eiweiß infolge einer besonderen Durchlässigkeit der Darmwand in nicht völlig abgebautem Zustand diese letztere passiert, immer antwortet der Organismus mit einer Temperatursteigerung. Umgekehrt läßt das Vorhandensein einer Temperatursteigerung auf einen Eiweißabbau irgendwelcher Art im Organismus schließen. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß dasjenige, was gemeinhin als Fieber bezeichnet wird, mit jener die Anaphylaxie begleitenden Temperatursteigerung zu identifizieren ist. Bei Masern, Scharlach und manchen anderen Infektionskrankheiten wird das Bild der Ueberempfindlichkeitsreaktion durch den Hautausschlag vervollständigt.

Auch das Erscheinungsbild der Eklampsie dürfte in die Gruppe der Ueberempfindlichkeitsreaktionen zu verweisen sein, da der Abbau des in die Blutbahn gelangenden Plazentaeiweiß durch die proteolytischen Abwehrfermente (Abderhalden)¹⁾, die sich im Plasma gegen dieses blut- bzw. plasmafremde Eiweiß richten, zu anaphylaktischen Stoffen der partiellen Eiweißspaltung führen muß, die nicht bei allen Individuen rasch

¹⁾ Abderhalden, loc. cit. im folgenden.

genug dem weiteren Abbau unterliegen, um anaphylaktische Störungen zu vermeiden. Für diese Auffassung spricht die von Abderhalden¹⁾ festgestellte Tatsache, daß an Nephritis gravidarum leidende Patientinnen einen mangelhaften oder fehlenden Abbau von Plazentaeiweiß und -pepton zeigen, während ein Abbau sofort zu konstatieren ist, wenn ein solches Serum mit dem Serum einer anderen Graviden vermischt wird. Denn normalerweise enthält solches Serum auch gegen die Peptone und andere Produkte der partiellen Spaltung des Plazentaeiweiß gerichtete Abwehrfermente, welche die anaphylaktisch wirkenden und zugleich durch ihre Anhäufung den weiteren Angriff von Plazentaeiweiß hemmenden ersten Abbauprodukte eliminieren. Wegen der Gefahren der Bluttransfusion — die in Fällen von Eklampsie auf der hier vermuteten Basis theoretisch die Möglichkeit einer Heilung durch die Abwehrfermente des Serums normaler Graviden in sich schliesse — könnte man daran denken, die gefährdeten Individuen entweder selbst aktiv mit Plazentapepton zu immunisieren und hierdurch die mehr oder weniger stark herabgesetzten hydrolytischen Fähigkeiten des betreffenden Organismus gegenüber den anaphylaktisch wirksamen albumose-peptonartigen Eiweißspaltprodukten zu vermehren, oder aber, wo dieser Mechanismus bei einem Individuum versagt, dasselbe passiv mit dem Serum von Tieren zu behandeln, denen Plazentapepton eingespritzt worden ist. Daß Peptoninjektionen instande sind, den Organismus gegen sonst tödliche Dosen anaphylaktischer Stoffe zu schützen, haben z. B. Delezenne und Ledebt bei Kaninchen gezeigt, die durch solche Injektionen vor der Wirkung von Anaphylatoxinen bewahrt wurden, welche diese Forscher durch die Einwirkung von Kobragift auf Eiweiß erzeugten.

Dabei dürfte jedoch das ziemlich rasche Verschwinden der Abwehrfermente aus dem Blut nicht übersehen werden. Abderhalden²⁾ gibt für die auf Plazentaeiweiß eingestellten 14—21 Tage an (so daß jedenfalls eine Peptonimmunisierung öfters zu erfolgen hätte). Ein Gegenstück hierzu bildet der Befund von Nolf³⁾, daß bei männlichen Kaninchen und Meerschweinchen schon 14 Tage nach erfolgter Kastration anaphylaktische Erscheinungen bei der Injektion von Hodenextrakt zu beobachten waren, während die normalen Tiere keine derartigen Erscheinungen zeigten.

Die Opsoninreaktion und ihre Anwendung. Für den Nachweis des lytischen Immunkörpers kommt der auf der Ein-

¹⁾ Abderhalden, Abwehrfermente, 2. Aufl., 1913, S. 121 u. 122.

²⁾ Abderhalden, Abwehrfermente, 2. Aufl., 1913,

³⁾ Nolf, Arch. internat. de Physiol. 10, 37; Bull. acad. Royal de Belgique, Cl. des sc. (1911) 71.

schaltung des Leukozytenapparates beruhenden opsonischen Methode ebenfalls große Bedeutung zu. Betrachtete man früher, ja zum Teil noch jetzt, die von Wright als Opsonine bezeichneten Substanzen als besondere Stoffe, durch deren Gegenwart das Blut die in ihm kreisenden Bakterien für die Phagozytose stimuliert, so sind diese Stoffe nach der Auffassungsweise von Much vielmehr mit dem lytischen Immunkörper selbst zu identifizieren. Der opsonische Einfluß eines Serums wäre nichts anderes als eine Folgewirkung der Bakteriolyse, die dem Nachweis auf dem Umweg über die Phagozytose zugänglich ist. Denn die Leukozyten reagieren schon, bevor es zu einer völligen Bakteriolyse, ja selbst bevor es zu einer völligen Bakteriozidie gekommen ist, auf die durch den Immunkörper oder die normalen bakteriolytischen Substanzen des Organismus veränderten Bakterien. Überhaupt dürften alle Faktoren, welche die Vitalität der Bakterien vermindern, einer Vorbereitung der letzteren für die Aufnahme durch die Leukozyten gleichkommen. Von Bedeutung sind in dieser Hinsicht die aus den Bakterienleibern in Freiheit gesetzten Endotoxine, deren Wirkung auf die Phagozytose von Dudgeon, Panton und Wilson¹⁾ zur Differenzierung von Bakterien herangezogen worden ist. Ferner geht aus den Versuchen von Hamburger, de Haan und Bubanovic²⁾ hervor, daß Chloroform, Jodoform und andere lipoidlösliche Stoffe³⁾ die Phagozytose sehr beträchtlich zu beschleunigen und nach einem Verlust dieses Vermögens durch längeres Stehen der Leukozyten zu regenerieren vermögen. Das Jodoform wirkte noch in einer so geringen Konzentration wie 1 : 5 000 000.

Mit der Herabsetzung der Vitalität und ihren je nach dem Objekt verschiedenen Äußerungen könnte die Begünstigung von Adhäsionserscheinungen zwischen den passiv gewordenen Bakterien und den Leukozyten in Zusammenhang stehen, welche Barikine⁴⁾ als ein erstes und wesentliches Moment im Mechanismus der Phagozytose betrachtet.

Die vorhin genannten Forscher selbst nehmen allerdings nicht eine Beeinflussung der Bakterien durch die erwähnten Stoffe, sondern der Leukozyten an, indem sie

¹⁾ Dudgeon, Panton u. Wilson, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 82 (1910) 406, 83 (1910) 33.

²⁾ Hamburger, de Haan u. Bubanovic, Koninkl. Akad. van Wetensch. Amsterdam 19 (1911) 894; Archives néerland. sc. exact. et nat. [3] Ser. B 1 (1911) 1.

³⁾ Kampfer wirkte dagegen umgekehrt abschwächend auf die Phagozytose ein.

⁴⁾ Barikine. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap, I. Teil 8 (1910) 72.

sich vorstellen, daß deren Oberflächenspannung herabgesetzt werde, wodurch die amöboiden Bewegungen eine Vermehrung erfahren. Doch steht dies nicht im Einklang mit dem im allgemeinen bei Einzelligen beobachteten Verhalten gegenüber narkotisch wirkenden, lipoidlöslichen Stoffen von der Art des Chloroforms, welche gerade umgekehrt eine Vermehrung der Oberflächenspannung und damit eine Herabsetzung der Beweglichkeit bewirken.

Das Prinzip der opsonischen Methode ist ungemein einfach. Man mischt eine Emulsion der in Frage kommenden Bakterien, z. B. Tuberkelbazillen, einerseits mit dem zu prüfenden Tuberkulosekranken-serum und Leukozyten, anderseits mit Normalserum und Leukozyten und stellt bei den einige Zeit sich selbst bei 37—40° überlassenen Mischungen am ausgestrichenen und gefärbten Präparat die Zahl der Bazillen fest, welche von 100 Leukozyten in beiden Fällen aufgenommen worden sind. Der Quotient der unter dem Einfluß des Phthysikerserums von den Leukozyten aufgenommenen Keimzahl und der Keimzahl, welche in Gegenwart des Normalserums phagozytiert worden ist, ergibt den sog. opsonischen Index. Derselbe gibt ein Maß ab für den Antikörpergehalt des Organismus gegenüber einem bestimmten Erreger.

Der opsonische Index ist dann vor allem aber auch qualitativ geeignet, den in irgendeinem Fall vorliegenden Erreger einer Erkrankung ausfindig zu machen oder bei einer Mischinfektion zu erkennen, welcher Anteil den einzelnen Bakterien an der fraglichen Infektion zukommt.

Außer diesem diagnostischen Wert einer Bestimmung des opsonischen Index hat man demselben auch prognostische Bedeutung zugeschrieben. Doch haben sich die Hoffnungen, welche in dieser Richtung an die opsonische Methode geknüpft worden sind, als unbegründet erwiesen, was bei der Zweischneidigkeit des bakteriziden Prinzips nicht zu verwundern ist. Auch müßte man (für prognostische Zwecke) vor allem mit lebendem, vom Patienten selber stammendem Erregermaterial und mit seinen eigenen Leukozyten arbeiten um ein Bild von der Funktionstüchtigkeit des im Organismus sich abspielenden opsonischen Mechanismus zu erhalten.

Die Ausführung der Opsoninreaktion gestaltet sich folgendermaßen: Man läßt nach dem von Much¹⁾ empfohlenen Verfahren aus der Armvene 8,5 ccm Blut in ein zuvor mit 1,5 ccm 10%iger Natriumzitratlösung beschicktes Gefäß fließen und hebt nach dem Absetzen der Blutkörperchen die Schicht von Leukozyten ab, die sich über den Erythrozyten in Suspension befindet. Man zentrifugiert hierauf die Leukozyten vom Plasma ab, schwemmt sie in Kochsalzlösung auf,

¹⁾ Much, Immunitätswissensch. 1911, S. 140.

zentrifugiert wieder und stellt eine Emulsion der weißen Blutkörperchen in Kochsalzlösung her.

Die Bakterienaufschwemmung wird durch Zerreiben einer Platinöse junger Agarkultur in Kochsalzlösung hergestellt. (Bei Tuberkelbazillen ist empfohlen worden, abgetötete, käufliche Kulturen, die im Achatmörser erst trocken, dann unter tropfenweisem Wasserzusatz zerrieben werden, zu verwenden. Doch verläßt man damit das der Opsoninmethode ursprünglich zugrunde liegende Prinzip. Statt der Herabsetzung der Vitalität der Erreger kommen dann nur noch die aus den toten Bakterienleibern in Freiheit gesetzten Endotoxine als Phagozytose begünstigendes Moment in Betracht. Die mit lebenden und toten Bakterien erhaltenen Resultate dürften daher nicht in eine Reihe gestellt werden.)

Die Emulsion wird nach den Angaben von Much (loc. cit.) in ein Röhrchen eingeschmolzen, gut durchgeschüttelt, nach dem Absetzen der Klumpen abgeschüttelt, zentrifugiert und die obere, nur schwach opaleszierende Schicht in verdünntem Zustand verwendet.

Patientenserum und Kontrollserum werden in gebogenen Glasröhrchen aus dem Ohr läppchen oder aus der Fingerkuppe entnommen. Das möglichst frisch zu verwendende Serum wird am besten in Verdünnungen von 1:50 oder 1:100 verwandt, und zu je 1 ccm ca. 1 Tropfen des komplementhaltigen Normalserums gesetzt. Nun stellt man sich die erforderlichen Mischungen:

a) Leukozyten + Bakterien + Krankenserum

und

b) Leukozyten + Bakterien + Normalserum

in der Weise her, daß man der Reihe nach Leukozyten, Bakterien und Serum in einer fein ausgezogenen Kapillare jedesmal bis zur Marke aufsaugt. Dann bläst man den Inhalt auf einen reinen Objektträger aus, saugt wieder auf und wiederholt dies zur sorgfältigen Mischung mehrmals. Nach dem letzten Aufsaugen wird das Ende der Pipette zugeschmolzen und dieselbe 5—15 Minuten, je nach der Bakterienart, in den Opsonierapparat gelegt. Hierauf bläst man den Inhalt der Pipette auf einen Objektträger aus und färbt (nach der Fixierung mit Formolalkohol oder gesättigter Sublimatlösung) mit Methylenblau, Karbolthionin oder Giemsalösung und zählt je 100 Leukozyten aus. Der Quotient der von den Leukozyten im Patientenserum aufgenommenen Keimzahl und derjenigen, die von den Leukozyten im Normalserum aufgenommen worden ist, ergibt den opsonischen Index.

Ist derselbe über 1,2 erhöht, so liegt vermehrte Opsonierung

vor. Das untersuchte Serum ist also schon mit den nämlichen Bakterien in Berührung gekommen, gegen die bei dem Versuch gerade geprüft wird, so daß es in dem Patientenserum zu der Ausbildung des spezifischen lytischen Immunkörpers gekommen ist.

Die Komplementbindungsreaktion und ihre Anwendungen. Als letztes der indirekten Verfahren zum Nachweis des lytischen Immunkörpers möge die Komplementbindungsreaktion in die Erörterung gezogen werden. Diese von Bordet und Gengou entdeckte Reaktion, bei welcher die Ausschläge des bakteriolytischen Systems durch die Einschaltung eines hämolytischen Systems verstärkt werden, hat sich trotz der Kompliziertheit ihrer Ausführung in der Praxis nach mehr als einer Richtung hin eingebürgert. Gleichviel ob lebende Bakterien oder gelöste Bakterienleibessubstanz oder das Extrakt eines Blutfleckens usw. vorliegen, immer macht sich das spezifische Aufspaltungsvermögen des Serums eines mit der betreffenden Eiweißart vorbehandelten Tieres geltend, und es ist dieser Verdauungsvorgang, wie dies schon an anderer Stelle besprochen worden ist, geknüpft an die Verankerung des in jedem nicht erhitzten Serum vorhandenen Komplements.

Aber nicht allein das geformte und ungeformte Eiweiß irgendwelcher Art, sondern auch die roten Blutkörperchen sind der durch Austritt von Blutfarbstoff sich äußernden Lyse zugänglich, wenn sie mit einem spezifisch gegen sie eingestellten sog. hämolytischen Serum in Berührung gebracht werden, und auch hier ist das unspezifische Komplement für das Zustandekommen der fermentativen hämolytischen Wirkung ¹⁾ unerlässlich. Zerstört man nun durch Erhitzen in beiden Sera das Komplement und ersetzt dieses dann durch Zusatz von frischem Meerschweinchenserum, so konkurrieren nunmehr zwei Systeme um dieses Komplement, und dasjenige, welches einen zeitlichen Vorsprung besitzt, ist Sieger. Das später eintreffende System — bei der üblichen Versuchsanordnung ist es das hämolytische — findet kein Komplement mehr vor, und es bleibt daher die an dieses gebundene Reaktion, die Hämolyse, aus.

Daß das bakterizide und das hämolytische Komplement übereinstimmen, hat H. Braun ²⁾ durch die gegenseitige Vertauschbarkeit ³⁾ mittels verschiedener Tiersera erwiesen.

¹⁾ Ueber die enzymatische Natur der hämolytischen Komplementwirkung vgl. Rusznyák, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 8 (1911) 421; Bail u. Suzuki, Ebenda 8 (1911) 592.

²⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 9 (1911) 665.

³⁾ Ueber partielle Vertauschbarkeit der Komponenten, die bei der Komple-

Die Anwendung der Komplementbindungsreaktion zur Untersuchung verdächtiger Bakterienstämme mit bekannten Sera oder umgekehrt. Eine Nutzenanwendung des vorhin beschriebenen Verhaltens wird durch den grundlegenden Versuch von Bordet illustriert, welcher zu Mischungen von je 0,5 ccm des komplementhaltigen Meerschweinchenserums und 0,5 ccm Cholera-vibrionenemulsion, einerseits 0,5 ccm auf 55° erhitztes, vom Kaninchen gewonnenes Choleraimmunserum, andererseits dieselbe Menge gleichbehandeltes Normalkaninchenserum hinzufügte und die Gemische während einer Stunde sich selbst bei Bruttemperatur überließ. Außerdem wurde eine entsprechende Mischung vom Meerschweinchenserum und Choleraimmunserum ohne die Vibrionenemulsion als Kontrolle angesetzt. Hierauf wurden die Gemische versetzt mit zwei Tropfen gewaschener Kaninchenblutkörperchen und 0,2 ccm des dazu gehörenden spezifischen hämolytischen Serums, das man zuvor durch Erhitzen auf 55° seines Komplements beraubt hatte. Im Gegensatz zum Immunserum, in welchem infolge der Komplementbindung durch das bakteriolytische System die Hämolyse ausblieb, war im Normalserum und der Kontrolle vollständige Hämolyse eingetreten, weil hier die Ursache einer Komplementbindung — beim Normalserum der spezifische Ambozeptor, bei der Kontrolle die Vibrionen — nicht vorhanden ist.

Die Typhusdiagnose. In ganz analoger Weise haben Wassermann und Bruck mittels der Komplementbindung die Gegenwart von lytischem Immunkörper im typhösen Serum nachgewiesen.

Auch bei dieser der Präzipitationsprobe an Empfindlichkeit überlegenen Reaktion kommt analog der Bordetschen Versuchsanordnung Typhusbazillenextrakt einerseits mit typhösem, andererseits mit normalem Serum in Berührung, und nach einiger Zeit werden Hammelblutkörperchen und deren spezifisches Antiserum zu den Mischungen gesetzt.

Das hämolytische Serum wird nach Much¹⁾ in folgender Weise erhalten: Man fängt das Blut in 1,5%iger Natriumzitratlösung auf, wäscht die abgesetzten Blutkörperchen durch mehrmaliges Zentrifugieren mit physiologischer Kochsalzlösung serumfrei und spritzt 1—2 ccm einer 10%igen Aufschwemmung derselben

mentwirkung eine Rolle spielen, siehe Marks, Ebenda 8 (1911) 508; vgl. auch Fraenkel, Ebenda 8 (1911) 781, der auf Grund des gegenseitigen Verhaltens der Komplementeile (wobei eine Verringerung des Albuminteils eine viel stärkere Wirkung auf die Hämolyse besitzt, als eine Verringerung des Globulinteils) und des Fehlens quantitativer Bindungsverhältnisse an katalytische Beeinflussungen denkt.

¹⁾ Much, loc. cit. S. 146.

alle 5–6 Tage Kaninchen in die Ohrvene ein. Ist das Antiserum hochwertig genug, was gewöhnlich nach der dritten bis vierten Einspritzung der Fall ist, so wird das Tier entblutet, das erhaltene Serum $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erhitzt und zur Konservierung mit Glycerin \overline{aa} versetzt.

Hier wie bei allen anderen bakteriellen Erkrankungen ist die ausbleibende Hämolyse im Patientenserum für die Gegenwart des lytischen Immunkörpers beweisend und damit zugleich dafür, daß das Individuum, von welchem das wirksame Serum stammt, irgend einmal mit dem betreffenden Erreger in Berührung gekommen ist. Bei der Verwendung von Bazillenextrakten für die Diagnose mikrobieller Krankheiten muß in einem Vorversuch die größte Extraktmenge ermittelt werden, die für sich allein noch kein Komplement zu binden vermag. Für den Hauptversuch wird die Hälfte dieser Menge mit 0,1 oder 0,2 ccm der durch $\frac{1}{2}$ stündiges Erhitzen auf 56° inaktivierten Sera und 0,1 ccm frischem Meerschweinchenserum vermischt. Nach einiger Zeit fügt man 1 ccm einer 5%igen Aufschwemmung von Hammelerythrozyten und 1 ccm einer der dreifach lösenden Minimaldosis entsprechenden Verdünnung des gleich den anderen inaktivierten hämolytischen Kaninchenserums hinzu.

Die Austitrierung des hämolytischen Serums wird so vorgenommen, daß man 1 ccm steigender Verdünnungen desselben mit 1 ccm frischen, auf 1:10 verdünnten Meerschweinchenserums und 1 ccm 5%iger Hammelerythrozytenaufschwemmung (in physiologischer Kochsalzlösung) 1 Stunde bei einer Temperatur von 37° beläßt und nun die größte Verdünnung feststellt, bei welcher gerade noch vollkommene Hämolyse stattfindet. Diese lösende Minimaldosis wird als Titer des Antiserums bezeichnet. Bei sehr exakten Versuchen muß auch die Austitrierung des Komplements (gegen die 3fach lösende Minimaldosis) vorgenommen werden.

Die Echinokokkendiagnose. Wichtiger als für die Diagnose bakterieller Infektionen, sowie für Karzinom usw.)¹⁾, wobei man sich meist der bequemereren anderen immunochemischen Methoden bedienen kann, ist die Komplementbindungsreaktion für die Erkennung der Echinokokkenerkrankung geworden. An Stelle des Extrakts wird hier Hydatidenflüssigkeit vom Schaf verwendet, welche geradeso wie das Extrakt zuvor austitriert werden muß. Die übrigen Versuchsbedingungen sind unverändert, doch empfiehlt es sich, das zu prüfende inaktivierte Menschenserum in höheren Dosen (0,3–0,4 ccm) anzuwenden.

¹⁾ Daß die Methode auch für die Karzinomdiagnose Verwendung finden könnte, hat Barratt, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 83 (1911) 359, durch die Feststellung einer Komplementablenkung bei Mäusekarzinom erwiesen, die wohl durch Tumorprotease oder Lipase veranlaßt sein dürfte. (Vgl. im vorigen.)

Auch die Bandwurmlipoide sind nach K. Meyer¹⁾ zur Komplementbindung befähigt, wobei die Reaktion des Mediums von Bedeutung ist. Säuren verstärken die Bindungsfähigkeit, während sie durch Alkalien aufgehoben wird. Im allgemeinen scheinen jedoch Säuren mehr noch als Alkalien bei der spezifischen wie bei der im folgenden angeführten unspezifischen Komplementbindungsreaktion (Wassermann) hemmend zu wirken. Die hämolytischen Ambozeptoren büßen ebenfalls ihre spezifischen Funktionen ein²⁾. Auch Salzlösungen sind wohl nicht ganz bedeutungslos³⁾.

Die Eiweißdifferenzierung im engeren Sinn mit besonderer Berücksichtigung des forensischen Blutnachweises. Die größte Bedeutung der Komplementbindungsreaktion liegt außerhalb des pathologischen Gebietes, und es ist das Verdienst von Neißer und Sachs, dieselbe für die gewöhnliche Eiweißdifferenzierung in die Praxis umgesetzt zu haben. Kaum eine andere Immunkörperreaktion vermag mit derselben zu konkurrieren, lassen sich doch weit über die Empfindlichkeitsgrenze der Präzipitinmethode hinaus bei im großen ganzen demselben Anwendungsbereich noch Spuren von Eiweiß mittels der Komplementbindung erkennen.

So haben Wendelstadt u. Toni Fellmer, loc. cit., die Differenzierung von Pflanzeiweiß auch mittels der Komplementbindung ausgeführt, und Schütze⁴⁾ hat nach der nämlichen Methode einzelne Hefearten differenziert mit dem Erfolg, daß sich ober- und untergärige Bierhefe auf diesem Wege unterscheiden ließen, nicht aber Getreide- und Kartoffelhefe. Dagegen hat Thöni⁵⁾ die serologische Methode ohne Erfolg zur Differenzierung von Pflanzenarten zum Zweck des Nachweises von Getreidemehlverfälschungen anzuwenden versucht.

Bei den minimalen Eiweißmengen, mit denen der mit der Untersuchung einer Blutspur betraute gerichtliche Chemiker zu rechnen hat, bedeutet die große Empfindlichkeit einen durch die umständliche Ausführung nicht kompensierten Vorteil. Hier ist eine vorherige Austitrierung des wiederum durch frisches Meerschweinchenserum gelieferten Komplements gegen die doppelte Menge der minimallösenden Dosis des hämolytischen Serums mit Rinderblutkörperchen vorbehandelter Kaninchen notwendig. Es kommt hierauf das 1½—2fache

¹⁾ K. Meyer, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 7 (1910) 732, 9 (1911) 530, 11 (1911) 211.

²⁾ Siehe Abramow, Zeitschrift f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 8 (1910) 145.

³⁾ Vgl. über den Einfluß von hypertonen Kochsalzlösungen sowie physiologischen Lösungen des Kalzium- und Bariumchlorids auf das Komplement v. Dungern u. Hirschfeld, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap., I. Teil 10 (1911) 131.

⁴⁾ Schütze, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap. 8 (1911) 611.

⁵⁾ Thöni, Mitteil. f. Lebensmitteluntersuch. u. Hygiene 1 (1911) 175.

derlösenden Minimalmenge des Komplements zur Verwendung. Ebenso titriert man zuvor das Immunserum aus, das von Kaninchen stammt, die einer Vorbehandlung mit der Eiweißart, auf welche man prüfen will, unterworfen worden sind. Man erhält z. B. ein Immunserum gegen Menscheneiweiß am besten durch in Intervallen wiederholte Einspritzungen von Menschenserum in die Ohrvene von Kaninchen (siehe bei Präzipitation).

Handelt es sich um die Prüfung auf die Gegenwart von Menscheneiweiß, so wird der Titer des Antimenschenserums gegenüber 0,0001 ccm Menschenserum festgestellt. Die 1½fache bis doppelte noch eine Komplementbindung ergebende Menge des Antiserums wird dann als Testdosis verwendet¹⁾. Nach der Prüfung derselben gegen steigende Verdünnungen von Menschenserum wird der Hauptversuch angestellt, bei dem fallende Mengen des fraglichen Blutfleckenextrakts mit den für den betreffenden Fall ermittelten Testdosen des Antiserums und des Komplements zusammengebracht werden. Als Stammlösung des Extrakts wählt man die leicht mittels der Kochprobe (siehe Präzipitation) kontrollierbare Verdünnung, die einer Eiweißkonzentration von 1:1000 entspricht. Nach 1stündigem Verweilen der Mischungen bei 37° fügt man 1 ccm der 5%igen Aufschwemmung von Rinderblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung und 1 ccm der doppelst lösenden Minimalmenge entsprechenden Verdünnung des inaktivierten hämolytischen Serums hinzu. Eine positive Reaktion von 0,01 ccm Extrakt und darunter mit der Testdosis des Antiserums ist beweisend dafür, daß der untersuchte Blutfleck vom Menschen stammt.

Die Wassermannsche Reaktion (unspezifische Komplementbindungsreaktion). Der spezifischen Komplementbindungsreaktion steht noch eine unspezifische gegenüber, die von Wassermann und Bruck für die Luesdiagnose eingeführt worden ist. Trotzdem die genannten Forscher, von dem Gedankengang der spezifischen Komplementbindung beeinflusst, die Reaktion aufgefunden haben, erwies sich dieselbe in der Folge als etwas prinzipiell von der Immunkörperreaktion Verschiedenes. Denn nicht nur das in Ermangelung einer Spirochätenreinkultur von Wassermann und Bruck benutzte Leberextrakt luetischer Föten zeigte die Fähigkeit, Komplement zu binden, sondern auch das Extrakt normaler Menschen- oder Meerschweinchenherzen.

Noch unentschieden ist, ob, wie dies Weil und Braun vermuten, unter dem Einfluß der Spirochäten, eventuell auch anderer Mikroorganismen (da die Wassermannsche Reaktion auch bei Lepra,

¹⁾ Höhere Dosen sind ungeeignet, weil die Komplementbindung wie andere Immunkörperreaktionen ein Konzentrationsoptimum besitzt.

Frambösie, Malaria, Scharlach und Tumoren positiv ausfallen kann) Organeiß in die Blutbahn gelangt, gegen welches der Organismus einen echten lytischen Immunkörper ausbildet, oder ob die Auffassung von Neubauer, Elias, Salomon, Porges und Much mehr für sich hat, wonach eine einfache unspezifische kolloide Fällungsreaktion die Ursache der Komplementbindung wäre. Im letzteren Fall würde nicht die geringste Beziehung der Wassermannschen Reaktion zur Wirksamkeit der Proteasen bestehen, und mit Rücksicht auf diese Möglichkeit erübrigt sich ein näheres Eingehen auf diese Form der Komplementbindung, dies um so mehr, als die Ausführung übereinstimmt mit der bei der Echinokokkendiagnose erörterten.

Besteht nicht die zweite Annahme, sondern die erste zu Recht, so wäre die Luesreaktion¹⁾ der im folgenden besprochenen, von Geißler aufgefundenen und zur Diagnose und Differenzierung von Psychosen empfohlenen Methode verwandt.

Die Reaktionen auf blutfremdes Material.

Die Psychosereaktion von Geißler. Geißler erhielt verschiedene Immunkörperreaktionen (Präzipitation, Komplementbindung) stärker, d. h. bei höheren Verdünnungen, wenn er das Serum von Tieren, welche er mit Psychosenserum vorbehandelt hatte, mit Psychosenserum reagieren ließ, als wenn er an Stelle des letzteren Normalserum verwendete. Es ist daraus der Schluß gezogen worden, daß bei bestimmten Geisteskranken Gehirnzellenbestandteile in den Kreislauf gelangen, gegen welche ein Tier, dem solches Serum eingespritzt wird, besondere Antikörper bildet, die zu den gegen normales Serumeiß erzeugten hinzukommen und die erhöhte Reaktionsfähigkeit gegenüber Psychosenserum bedingen.

Wegener²⁾ hat gezeigt, daß sich ein wiederholt beobachteter Hirnabbau als prognostisch ungünstiges Zeichen verwerten läßt. So werden bei Paralyse, Tabes und Lues cerebri Gehirn und Rückenmark abgebaut. Wegener sowohl als Grigorescu³⁾, legen Gewicht auf den Hirnabbau bei Epilepsie und dessen Fehlen bei Hysterie, da sich hierdurch der epileptische vom hysterischen Anfall unterscheiden läßt. Der epileptische Anfall würde nach Grigorescu durch die Intoxikation von seiten der Abbauprodukte der Gehirnsubstanz ausgelöst (Gehirnpeptone) und würde demnach als eine Art Peptonschock aufgefaßt werden können⁴⁾.

¹⁾ v. Wassermann, Hämolyse, Zytolyse und Präzipitine, Leipzig 1910.

²⁾ Wegener, Münchener med. Wochenschr. (1914) 15.

³⁾ Grigorescu, Med. Klinik (1914) 418.

⁴⁾ Ueber experimentellen Hirnabbau durch Injektion von Urohypotensin siehe Abelous u. Soula, Compt. rend. Soc. Biol. 76 (1914) Nr. 18, 77 (1914) Nr. 21.

Gegen andere Organe sollen sich ebenfalls Abwehrfermente bei bestimmten Geisteskrankheiten ausbilden. Außer dem Abbau verschiedener Organe von Epileptischen bei Epilepsie hat Wegener Abbau der Leber bei Melancholie und von Genitaldrüsensubstanz bei Hebephrenie angegeben.

Auch Gehirnschädigungen durch Medikamente sind in Betracht gezogen worden, mit dem Resultat, daß Wegener¹⁾ bei der Verabreichung von Narkotika, wie Brom, Paraldehyd und Opium, nach kurzer Zeit keine Abwehrfermente gegen die für eine Schädigung in Frage kommende Nervensubstanz konstatieren konnte, während bei längerem Gebrauch bisweilen nach dem Dialysierverfahren²⁾ ein Gehirnabbau im Blut der behandelten Personen zu konstatieren war. Da nach Nieszytka³⁾ verschiedene Abschnitte des Nervensystems ungleichartige Abwehrfermente hervorrufen, würde sich hieraus eine Methode ergeben, um für basische Narkotika in Betracht fallende Unterschiede im Angriffsort festzustellen⁴⁾.

Vielleicht handelt es sich bei den in Frage kommenden Stoffen nicht um Eiweiß, sondern um Lipoide, welche ja in relativ beträchtlicher Menge am Aufbau des Gehirns beteiligt sind, und im Antiserum wäre dann ein gegen einen oder mehrere Lipoidstoffe gerichtetes Enzym anzunehmen. Die von Much⁵⁾ vermutete Zusammengehörigkeit der Geißlerschen Stoffe mit jenen, welche die von Much und Holzmann⁶⁾ festgestellte Hemmung der Kobragifithämolyse durch Geisteskranken-serum bedingen, würde auf Cholesterin hindeuten, da die antihämolytische Wirkung des Cholesterins gerade gegenüber Kobragift eine lange bekannte Erscheinung ist⁷⁾.

Wie aber auch die fraglichen Stoffe, die aus erkrankten Gehirnzellen oder (bei der Wassermannschen Reaktion [loc. cit.]) aus spirochäten- oder tumorbefallenen oder leprösen Organen, oder bei Organschädigungen durch Medikamente⁸⁾ aus diesen Organen in die

¹⁾ Wegener, Münchener med. Wochenschr. (1914) 1774.

²⁾ Siehe im folgenden.

³⁾ Nieszytka, Deutsche med. Wochenschr. (1914) Nr. 30.

⁴⁾ Es dürften jedoch auch andere Organschädigungen in Frage kommen. Wenigstens hat Richet, Compt. rend. 158 (1914) Nr. 5, Nr. 19, bei der Renarkose mit Chloroform, wie auch bei Chloroformbehandlung nach vorausgegangener Phosphoreinwirkung Leukozytose beobachtet, die bei erstmaliger Narkose fehlt, und dies auf eine Leber- und Nierenschädigung zurückgeführt, durch die Organeiweiß ins Blut gelangt und die Erscheinungen einer indirekten Anaphylaxie auslöst.

⁵⁾ Much, Immunitätswissensch. 1911, S. 188.

⁶⁾ Much u. Holzmann, siehe Näheres über diese außerordentlich interessante Reaktion Much, Ebenda, S. 186, 189 ff.

⁷⁾ Siehe darüber den *Allg. Teil* der Katalyse, S. 535, sowie Much, loc. cit. vorige Fußnoten, S. 190.

⁸⁾ Zum Nachweis solcher Organschädigungen und damit zur Feststellung der Brauchbarkeit oder Unbrauchbarkeit eines Medikamentes hat H. Ahrens, Zeitschr. f. d. ges. experim. Medizin 2 (1914) 397, die Prüfung auf Abwehrfermente

Blutbahn gelangen, beschaffen seien. sie stellen trotz ihrer Körper-eigenheit ein dem Blut fremdes Material dar, gegen welches sich der lytische Immunkörper gerade so richtet wie gegen körperfremdes Eiweiß und Fettstoffe, die in den Fall kommen. der parenteralen Verdauung zu unterliegen¹⁾.

Die Abwehrfermentreaktionen von Abderhalden: Die im vorigen besprochenen Tatsachen, welche die Immunitätswissenschaft zutage gefördert hat, leiten nun lückenlos über zu den schönen Arbeiten von Abderhalden, der einzig von den Gesichtspunkten des Enzymologen ausgehend, auf die abbauenden Wirkungen des lytischen Immunkörpers stieß und diesen, je nachdem sich derselbe gegen körperfremdes oder blut- bzw. plasmafremdes Eiweiß, Fett oder Kohlenhydrate richtet, als entsprechendes Abwehrferment (Protease, Lipase, Diastase oder — bei Rohrzucker als Antigen — als Invertase) charakterisierte.

Daß zwischen den Abwehrfermenten und der Immunität Beziehungen bestehen, ist natürlich Abderhalden nicht entgangen²⁾, und insbesondere mit Rücksicht auf die Anaphylaxie kam er zum Schluß, daß dieselben „unzweifelhaft in irgend einem Zusammenhang“ stehen³⁾. Auch hat Abderhalden die sowohl für diese, im Abschnitt über die Anaphylaxie eingehend beleuchtete Beziehung und die Zurückführung des anaphylaktischen „Schocks“ auf Eiweißspaltprodukte, wie für eine Identifizierung von Antikörpern mit diesen letzteren wichtige Tatsache hervorgehoben, daß während des auf den anaphylaktischen Schock folgenden Zustands der Antianaphylaxie. — in welchem

gegen die in Frage kommenden Organeisweiße empfohlen. Bei der Beurteilung der Resultate dürfte es wichtig sein, die Dauer der Einwirkung eines Medikaments auf den Organismus zu berücksichtigen.

¹⁾ Vgl. Abderhalden, Deutsche med. Wochenschr. (1912) Nr. 48, Nr. 88; Fauser, Psychiatrisch-neurologische Wochenschr., 31. Mai 1913; Münchener med. Wochenschr. (1913) Nr. 11; (1914) 126; siehe demgegenüber Bisgaard u. Korsbjerg, Deutsche med. Wochenschr. (1914) Nr. 27; mit Fauser übereinstimmend Wegener, Münchener med. Wochenschr. (1913) 1197 u. (1914) 15; I. Fischer, Sitzungsber. u. Abhandl. der naturforsch. Gesellsch. von Rostock 5 (1913) 3. Mai; Binswanger, Med. Klinik (1914) 417; Kafka, Ebenda (1914) 153; Abderhalden, Ebenda (1914) 243; Fuchs u. Freund, Münchener med. Wochenschr. (1914) 307; Schroeder, Berliner klin. Wochenschr. (1914) 1329; Justschenko, Das Wesen der Geisteskrankheiten und ihre biologisch-chemischen Untersuchungen. Dresden 1914.

²⁾ Abderhalden, Abwehrfermente, Vorwort zur 1. Aufl., S. VI.

³⁾ Abderhalden, Abwehrfermente, 2. Aufl., Berlin 1913, S. 57—62.

ein Tier auf Reinjektionen des betreffenden Eiweiß nicht mehr reagiert, (auch nach Rahel Hirsch und Leschke¹⁾ keinerlei Einschränkungen des Stoffumsatzes erfährt), — eine proteolytische Wirkung im Plasma der gespritzten Tiere nicht mehr nachgewiesen werden kann. Auch der Befund von de Waele²⁾, daß das Auftreten der Abwehrfermente mit der „Sekretion des Antithrombins“ parallel geht, könnte mit der gerinnungshemmenden Wirkung der gebildeten Eiweißspaltprodukte zusammenhängen. Das Ausbleiben der Eiweißspaltung dürfte sich nach den früheren Ausführungen (loc. cit.) dahin erklären lassen, daß die durch die Abwehrfermente bedingte Proteolyse gegenüber dem fremden Eiweiß durch die angesammelten Eiweißspaltprodukte eine völlige Hemmung erfährt. Hierdurch würde aber auch die Bildung neuer schockauslösender Eiweißspaltprodukte ausbleiben. Erst in dem Maß, als diese letzteren durch die gegen dieselben mobil gemachten Abwehrfermente des Organismus eliminiert werden, setzt die Proteolyse wieder ein, da ja die Abwehrfermente im Zustand der Antianaphylaxie nicht zerstört, sondern nur durch die Anhäufung der spezifischen Eiweißspaltprodukte, welche sie erzeugen, in ihrer Wirkung gehemmt worden sind. In bezug auf die mit jeder Reinjektion außerhalb des Zustands der Antianaphylaxie erfolgende Auslösung heftigerer Ueberempfindlichkeitsreaktionen bzw. Eintritt derselben bei immer geringeren Dosen als bei der erstmaligen Injektion des fremden Eiweiß, sei ebenfalls auf den die Ueberempfindlichkeit behandelnden Abschnitt verwiesen. Auch auf die Beziehung zu den anderen Immunitätsreaktionen braucht nicht nochmals eingegangen zu werden. Sie ergibt sich von selbst aus der hier im allgemeinen und für jede einzelne Immunitätsreaktion im besonderen vertretenen Auffassung, daß es sich um die in verschiedener Weise in die Erscheinung tretenden Wirkungen der spezifisch auf das körper- oder blutfremde Material sich einstellenden normalen Blutprotease (oder der Blutlipase) handelt.

In der durch die Ueberempfindlichkeitsreaktionen des Organismus gebotenen Dosenverminderung bei der Reinjektion steckt ein die Spezifität begünstigendes Moment. Abderhalden³⁾ hat darauf hingewiesen, daß bei sehr großen Substanzmengen oft überhaupt keine Abwehrfermente nachgewiesen werden können. Bei Reduktion dieser Menge treten Abwehrfermente auf, die aber nur gruppenspezifischen Charakter tragen, d. h. es wird z. B. durch Injektion von Stärkelösung oder Milch-

¹⁾ Rahel Hirsch u. Leschke, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 15 (1914) Nr. 2; siehe über Antianaphylaxie auch Jourevitsch u. Rosenberg, Compt. rend. Soc. Biol. 76 (1914) Nr. 14.

²⁾ de Waele, Compt. rend. Soc. Biol. 76 (1914) Nr. 14.

³⁾ Loc. cit. Fußnote 2 vorige Seite, S. 71,

zucker ein Abwehrferment erzeugt, das auch gegen andere Kohlenhydrate, z. B. Rohrzucker, gerichtet ist. Nur ganz minime Kohlenhydratmengen erzeugen lediglich ein streng spezifisches Abwehrferment, und das nämliche ist der Fall bei den Eiweißkörpern.

Die spezifisch eingestellte Blutprotease oder Blutlipase, welche die Immunitätswissenschaft unter dem Namen des lytischen Immunkörpers kennt, deckt sich nach dem Vorausgeschickten prinzipiell auf der ganzen Linie mit den spezifisch auf das körper- oder blut- bzw. plasmafremde Material sich einstellenden Abwehrfermenten Abderhaldens.

Man wird also in Fällen, in denen die erwähnten biologischen Immunkörperreaktionen stark positiv (vgl. im folgenden) ausfallen, auch einen positiven Ausfall der chemischen und physikalisch-chemischen Proben (Abderhaldenreaktion) erwarten dürfen. In der Tat haben Mühsam und J. Jacobsohn¹⁾ bei Anwendung der Dialysiermethode auf das Serum von Personen, die an Ueberempfindlichkeit gegen Krebs- und Krabbeneiweiß leiden, während des Anfalls positive Reaktionen beim Zusammenbringen der Sera mit solchem Eiweiß erhalten. Auch läßt sich, wie Jersatschenko²⁾ gezeigt hat, Pflanzeneiweiß außer durch die schon erwähnten biologischen Methoden durch die Ninhydrinreaktion differenzieren. So ergaben Flachs-, Nuß-, Weizenmehl und Avenin, die zuvor durch 18stündiges Spülen mit Leitungswasser und sechsmaliges Kochen mit destilliertem Wasser ninhydrinfrei gewaschen wurden, beim Zusammenbringen mit dem Antiserum von Kaninchen, die mit dem betreffenden Eiweiß vorbehandelt worden waren, nach 30—32 Stunden eine deutlich positive Ninhydrinreaktion.

Für den lytischen Immunkörper wurde nun aber — nach der hier vertretenen Auffassung — angenommen, daß derselbe aus einer auch normalerweise im Blut enthaltenen Protease durch spezifische Einstellung auf das körper- bzw. blut- oder plasmafremde Material entsteht, wodurch die Ausschläge ganz enorme Verstärkungen erfahren. Diese Auffassung rechtfertigte sich dort dadurch, daß die Immunitätswissenschaft normale Bakteriozidine, Agglutinine usw. kennt. Hier scheint nun ein Widerspruch zu den Befunden von Abderhalden zu bestehen, der eventuell auch gegen eine Identifizierung der Abwehrfermente mit dem lytischen Immunkörper ins Feld geführt werden könnte, denn das Meerschweinchenserum ist das einzige normale Serum,

¹⁾ Mühsam u. J. Jacobsohn, Deutsche med. Wochenschr. 40 (1914) Nr. 21.

²⁾ Jersatschenko, Deutsche med. Wochenschr. (1914) 1411.

an welchem Abderhalden die Fähigkeit, Eiweiß abzubauen, feststellte. Vielleicht ist aber der Widerspruch nur ein scheinbarer, dadurch bedingt, daß die biologischen Methoden unvergleichlich viel empfindlicher sind als die chemischen und physikalisch-chemischen. Der Uebergang von der normalen Protease oder Lipase zum lytischen Immunkörper — dem spezifischen Abwehrferment — mag durchschnittlich mit einer tausendfachen Wirkungssteigerung gegenüber der normalen Blutprotease einhergehen. Auch für sehr empfindliche Farbenreaktionen, wie die Biuret- und die Ninhydrinprobe, welche für den Nachweis der spezifischen Abwehrfermente durch die gebildeten Eiweißabbauprodukte von Abderhalden benutzt werden, dürfte aber ein Herabgehen um das Tausendfache sehr wohl mit einem Heruntersinken unter die Empfindlichkeitsgrenze verbunden sein, und dasselbe wäre der Fall bei der ohnehin nicht sehr empfindlichen polarimetrischen Methode. Nun hat zwar auch das im folgenden besprochene, von Hirsch (loc. cit.) in die Praxis der Ferment- und insbesondere der Abwehrfermentuntersuchung eingeführte, interferometrische Verfahren negative Ergebnisse gezeitigt, aber trotz der relativ großen Empfindlichkeit dieser Methode ist diejenige der biologischen Verfahren wohl kaum erreicht. Auf alle Fälle kann die Tatsache eines biologisch durch die Bakteriozidie bzw. die Bakteriolyse usw. noch nachweisbaren Eiweißangriffs im normalen Serum nicht anders als durch die Gegenwart einer Protease gedeutet werden. Man könnte nur die Frage aufwerfen, ob die sich spezifisch einstellenden Abwehrfermente statt von der humoralen, von der leukozytären Protease¹⁾ derivieren. Hierdurch würde sich ein völliges Fehlen derselben im normalen Serum erklären, und in der Tat hat Abderhalden²⁾ einen leukozytären Ursprung der Abwehrfermente in Betracht gezogen³⁾, die sich, wie gesagt, auf jedes körperfremde Eiweiß, Fett oder Kohlenhydrat und darüber hinaus auf jedes körpereigene, aber blut- resp. plasmafremde Material spezifisch einstellen.

Bei dieser Auffassung begegnet man allerdings der Schwierig-

¹⁾ Die Protease der Leukozyten, wie die gleich zu bewertende der Blutplättchen [siehe über bakterizide Substanzen der Blutplättchen Werbitzki, Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankh. 68 (1911) 63] spielt ja ebenfalls in der Immunitätswissenschaft eine Rolle.

²⁾ Abderhalden, Abwehrfermente, 2. Aufl., 1913, S. 79.

³⁾ Ein sehr gewichtiges Moment zugunsten dieser Auffassung dürfte der Befund von Kafka und Pförringer (loc. cit. S. 381, Fußnote 8) darstellen, wonach die Abwehrfermentbildung bei Tieren ausbleibt, deren Leukozytenzahl durch Behandlung mit Thorium auf ein Minimum reduziert worden ist.

keit, daß die leukozytären Immunkörper im Gegensatz zu den humoralen, die aus „Ambozeptor“ und „Komplement“ bestehen, nur eine Komponente besitzen. Durch die Untersuchungen von Bettencourt und Menczes¹⁾ ist aber gezeigt worden, daß geradeso, wie sich das Komplement bakteriolytischer Sera durch Erhitzen auf ca. 60° zerstören und durch Zusatz von Normalserum wieder ersetzen läßt, auch Gravidenserum durch Erhitzen auf 58—60° inaktiviert und durch Zusatz von Normalserum vom Mensch, Hund oder Meerschweinchen reaktiviert werden kann. Man würde daher die spezifische Komponente hier wie dort auf den thermostabilen Ambozeptor zurückführen können. Hiergegen ist zwar von Nieszytka (loc. cit.) auf die ungleichen Zeiten für die Nachweisbarkeit und das Fehlen einer Steigerung der Abwehrfermente durch wiederholte Sensibilisierung hingewiesen worden.

Was die Abwehrfermente gegen körpereigene, aber blutfremde Eiweiß- oder Fettstoffe betrifft, so hat Abderhalden²⁾ selbst, (unabhängig von der erwähnten Auffassung von Weil und Braun über den bei der Wassermannschen Reaktion in Betracht kommenden Immunkörper gegen körpereigenes Eiweiß und die gleich zu bewertende Auffassung von Geißler über körpereigenes Gehirnzellenmaterial und den hierdurch erzeugten lytischen Immunkörper im Serum von Geisteskranken), zwei derartige Fälle ins Auge gefaßt, bei denen mit dem Kreisen von plasmafremdem, jedoch körpereigenem Eiweißmaterial im Blut zu rechnen ist: Es sind die mit Knochensarkomatose verknüpfte Bence-Jonesche Albuminurie und die Gravidität. Bei dieser letzteren vermutete Abderhalden Abwehrfermente gegen Chorionzottenmaterial, da von verschiedenen Autoren ein zeitweises Abreißen von Zellen der Chorionzotten angegeben worden ist. Es stellte sich jedoch heraus, daß es nicht diese Elemente sind, gegen die sich zeitweise Abwehrfermente im Blut hätten bilden können, sondern daß vielmehr vom 8. Tage an konstant im Blut der Graviden Abwehrfermente gegen Plazentaeiweiß nachweisbar sind. Die Konstanz der Erscheinung gestattet die Diagnose der Gravidität, wenn unter den im folgenden näher ausgeführten Kautelen, die Abderhalden und seine Mitarbeiter angegeben haben, gearbeitet wird.

Bei Karzinomträgern könnten demgegenüber sowohl Abwehrfermente gegen lediglich blutfremde wie gegen körperfremde Stoffe in Frage kommen, je nachdem das Karzinom oder Sarkom als aus körpereigenem, embryonalem Gewebe hervorgehend gedacht wird,

¹⁾ Bettencourt u. Menczes, Compt. rend. Soc. Biol. 77 (1914) Nr. 22.

²⁾ Abderhalden, Abwehrfermente, 2. Aufl., 1913, S. 82 ff.

oder daß ihm nach Anlage und Entwicklung der Charakter eines körperfremden Parasiten zugeschrieben wird. Jedenfalls muß auch ein aus körpereigenem Gewebe hervorgehender Tumor, in dem Maß als er sich entwickelt, Differenzierungen seiner Eiweiß- und Fettstoffe erfahren, wodurch sich mehr und mehr der Charakter der Körpereigenheit verliert. Wäre dies nicht der Fall, so könnte man durch Behandeln eines Tieres mit Tumorgewebe auch keine Abwehrfermente gegen dieses letztere erzeugen, sondern es würde sich dann um Enzyme handeln, die gegen ein bestimmtes Körpereiweiß gerichtet sind.

Ein weiteres komplizierendes Moment dürfte in dem Umstand gegeben sein, daß es sich nicht nur um Abwehrfermente handeln wird, die auf eiweiß- oder fettartige Stoffe eines differenzierten Tumors ¹⁾ eingestellt sind, sondern daß unter dem Einfluß der Fermente, welche der Tumor gegen das Eiweiß der befallenen Gewebe richtet, noch eiweißartige Abbaustufen des körpereigenen Eiweiß in die Blutbahn gelangen, die dann ebenso plasmafremd wie das Material des Tumors selbst, ihrerseits die Bildung von Abwehrfermenten veranlassen. Man wird also, abgesehen von jenen Fällen, wo das Eiweiß sich selbst passiv verhaltender Zellen, wie z. B. der Plazenta oder wie abgetötetes Bakterienmaterial, oder wie ungeformtes Eiweiß, in den Organismus gelangt, mit zweierlei Abwehrfermenten zu rechnen haben: mit solchen Abwehrfermenten, die gegen das körperfremde Eiweiß usw., und mit solchen, die gegen körpereigenes, aber plasmafremdes Eiweiß gerichtet sind. Da nur mit einem einzigen Substrat auf das Vorhandensein des ihm entsprechenden Abwehrfermentes geprüft wird, so dürfte jedoch die Heterogenität der vorhandenen Abwehrfermente, vorausgesetzt, daß sich dieselben im Plasma nicht wechselseitig beeinflussen, keine Störungsquelle darstellen. Es könnte im Gegenteil eine praktische Nutzenanwendung für solche Fälle ins Auge gefaßt werden, wo sich aus dem klinischen Befund nicht ergibt, ob ein bestimmtes Gewebe von einem Tumor befallen ist oder nicht. So könnte man nicht nur durch die Prüfung eines Karzinomträgers auf die Fähigkeit seines Serums, nach dem Dialysierverfahren ²⁾ Tumorgewebe abzubauen, die Diagnose Krebs stellen ³⁾, sondern man könnte durch die Prüfung des

¹⁾ Dasselbe gilt für in den Körper eingedrungenen Bakterien. Ueber eine weitere Komplikation siehe im folgenden.

²⁾ Vgl. folgende Seiten.

³⁾ Abderhalden, Abwehrfermente, 2. Aufl., Berlin 1913. S. 123, hält nicht nur eine Frühdiagnose von Krebs auf diesem Wege für möglich, sondern

Serums des nämlichen Patienten auf Abbaufähigkeit gegenüber verschiedenen Organeiproteinen bzw. deren noch eiweißartige Abbauprodukte, den Metastasen, nachgehen, die der betreffende Krebs in diesem oder jenem Organ gebildet hat. Abwehrfermente gegenüber irgend einem Organeiprotein oder daraus gebildeten Albumosen und Peptonen würden sich eben nur dann in dem zur Untersuchung gelangenden Serum nachweisen lassen, wenn das fragliche Organ schon von dem Tumor befallen ist und als Folgeerscheinung der Organerkrankung noch eiweißartige Spaltprodukte solchen Organeiproteins an das Blut abgegeben worden sind.

Ja über die Prüfung auf Metastasen hinaus könnte das Studium der Abwehrfermente für die Frage der Krebsgenese selbst von großer Bedeutung sein. Bestünde die Theorie des versprengten embryonalen Gewebes zu Recht, so müßte sich das Serum eines mit embryonalem Gewebe behandelten Tieres ähnlich verhalten wie das Serum eines Tieres, welches mit dem Gewebe eines frühzeitig exstirpierten und daher dem embryonalen Gewebe noch relativ nahestehenden Tumors behandelt worden ist, d. h. es müßten die in beiden Fällen gebildeten Abwehrfermente einander ähnlich sein und mehr oder weniger ausgeprägt die Fähigkeit zum Abbau beider Substrate besitzen.

Handelt es sich jedoch nicht um versprengtes, von eigentlichen Keimzellen derivierendes Gewebe, sondern lediglich um Jugendgewebe, das am Ort des Entstehens des primären Tumors dem Einsetzen einer lebhaften Kernteilungstätigkeit seine Bildung und Weiterentwicklung verdankt, so gilt für den primären Tumor und seine enzymatische Wechselwirkung mit dem umliegenden Gewebe im wesentlichen dasselbe wie dies soeben für die Metastasen ausgeführt worden ist. Doch könnten sich Unterschiede zwischen in Bildung begriffenem „Ersatzmaterial“ und dem Material des ausgewachsenen Gewebes fühlbar machen, denzufolge sich z. B. bei einem Darmkrebs das aus den Zellen der Lieberkühnschen Krypten — (in welcher letzteren sich eine beständige Neubildung von Zellen vollzieht) — hervorgehende Tumorgewebe von dem lumenwärts gelegenen Verband ausgewachsener Darmepithelzellen unterscheiden ließe. Wie in dem angeführten Fall aus den Erneuerungsherden des Darmepithels der Tumor hervorgeht, so wären es, im Sinne der hier vertretenen Auffassung über die Krebsgenese ganz allgemein diejenigen Orte, an denen als Folge eines

auch eine Kontrolle der therapeutischen Maßnahmen, da 14 Tage bis 3 Wochen nach der Eliminierung der Karzinomzellen auch die Abwehrfermente gegenüber Krebsgewebe verschwunden sein müssen.

häufigen Zugrundegehens von Zellen und ganzen Zellverbänden, durch lebhaftes Mitosen Ersatzzellen nachgeliefert werden. Die Drüsen, deren sekretive Tätigkeit aufs engste mit dem Zugrundegehen von Zellen und dem Freiwerden ihrer Endoenzyme zusammenhängen dürfte¹⁾, weisen wie die schon erwähnten Epithelzellen der Darmschleimhaut, in den zur Zellregeneration führenden Mitosen den Faktor auf, der zur pathologischen Neubildung führen kann, wenn die Desorganisation der älteren Zellen oder das normale Nachrücken der Ersatzzellen aus irgend einem Grund gehemmt ist. Daß aus den Keimstätten eines Gewebes hervorgehende Tumoren, wie das betreffende normale Gewebe, vom Serum des Karzinomträgers selbst nicht gelöst werden können, würde sich dann auf die besprochene Resistenz der lebenden Gewebe den eigenen Proteasen gegenüber zurückführen lassen²⁾, sowie sich umgekehrt die Lösungsfähigkeit durch fremdes Serum aus der Artfremdheit erklären ließe. Die Resistenz auf dieser Basis nimmt dagegen in dem Maß ab, als der Tumor mit fortschreitender Differenzierung artfremden Charakter annimmt. Erst dann sind Abwehrfermente des Karzinomträgers gegen seinen eigenen Tumor zu erwarten, die aber, wie die durch Behandeln mit Tumorgewebe aktiv erzeugten, durch antitryptische Stoffe in ihrer lösenden Wirkung gehemmt werden³⁾. Die Abwehrfermente lassen sich nach Abderhalden⁴⁾ durch Einspritzen von Serum vermehren, das von einem Tiere stammt, welches durch Behandeln mit Tumorgewebe Abwehrfermente gegen dasselbe erzeugte — also nach der gewöhnlichen Methode der passiven Immunisierung —, ein Umstand, der von Abderhalden (l. c.) therapeutisch verwendet worden ist. Je größer die dem Karzinomträger auf diesem Wege einverlebte fremde Serummenge ist, desto eher kann diese Therapie von Erfolg begleitet sein, da abgesehen von der Anreicherung der Abwehrfermente, hierdurch zugleich die Konzentration der antitryptischen Stoffe herabgesetzt wird. Diese sind es auch, welche — wie schon früher angeführt wurde⁵⁾ — es fraglich erscheinen lassen, daß sich das dem betreffenden Gewebeeiweiß und seinen höheren Abbau-stufen gegenüber ausgebildete lytische Prinzip auch durch die übrigen Nachweismethoden für den „lytischen Immunkörper“ verrät. Außer

¹⁾ Woker, Probleme aus den Gebieten der Fermentchemie und der Sekretbildung, Vortrag gehalten in der Zool.-bot. Ges. zu Wien am 6. April 1922.

²⁾ Siehe im Abschnitt „Hemmungsstoffe der Proteolyse“, S. 313 ff.

³⁾ Vergl. im vorigen S. 321 u. 322.

⁴⁾ Abderhalden, Med. Klinik (1914) 188; Münchener med. Wochenschr. (1914) 1897.

⁵⁾ Loc. cit. diese Seite, vorletzte Fußnote und S. 346 u. 347.

der gerade im Hinblick auf die Krebsdiagnose in einem vorausgegangenen Abschnitt (S. 346—348) besprochenen, besonders zu bewertenden Meiostagminreaktion¹⁾ wäre z. B. an die Komplementbindungsmethode nach von Dungern und an die Präzipitinprüfung zu denken — an Fällungen mit dem betreffenden Organeiweiß also, die im Serum eines Patienten auftreten würden, in dessen Blut solches Eiweiß als Folge der Organerkrankung kreist — sowie an die Ueberempfindlichkeitsreaktion. Aber bisher hat einzig die Prüfung auf Abwehrfermente nach Abderhalden zum Ziele geführt. In der Tat ist es einleuchtend, daß die Kombination des Abbaubersuchs mit dem Dialysierverfahren, eine Möglichkeit bietet, die antitryptische Hemmung durch die Spaltprodukte zu beseitigen, die der Lösung des Tumors *in vitro* wie *in vivo* entgegensteht. Die sonst weniger empfindliche chemische Methode für den Nachweis des lytischen Immunkörpers erweist sich hier als überlegen.

Aus den zahlreichen klinischen Anwendungen, die der Nachweis von Abwehrfermenten nach Abderhalden gefunden hat, seien nur einige Beispiele²⁾ angeführt, um einen Begriff über die Vielseitigkeit der Anwendungsmöglichkeiten zu geben.

So hat Aschner³⁾ bei Chlorose Abbau von Ovarialsubstanz und Milzgewebe, bei Myomkranken von Ovarialsubstanz angegeben. Doyen u. Takamine⁴⁾ haben als ein Zeichen der Arteriosklerose und mit dem Grad derselben zunehmend die Abbaufähigkeit des Patientenserums gegenüber mesodermalem Gewebe beobachtet; Babes u. Mademoiselle H. Jonesco⁵⁾ haben übereinstimmend mit Nitescio bei Pellagrakranken gefunden, daß deren Serum das Zein des Mais abzubauen vermag, wobei jedoch diagnostisch zu berücksichtigen ist, daß auch Patienten mit Magen-Darmstörungen infolge des Durchtritts von unvollkommen abgebautem Zein durch die lädierte Darmwand die nämliche Wirkung ihrer Sera gegenüber Mais-eiweiß erkennen lassen. Lampé⁶⁾ hat bei Basedow Abwehrfermente festgestellt gegen Schilddrüse, Thymus und Ovarium; bei Myxödem und endemischem Kropf solche gegen Schilddrüse; bei Addisonscher Krankheit Abwehrfermente gegen Nebenniere; bei Akromegalie solche Enzyme gegen Hypophyse und Keimdrüse usw. Abbau von Schilddrüse, Nebenschilddrüse und Thymus, sowie von Muskelgewebe, nicht aber von Nebenniere, Pankreas und Hypophyse, fanden C. J. Pachon u. Marie Pachon⁷⁾ bei Myasthenie, die mit Störung der Funktion endokriner Drüsen

¹⁾ Siehe z. B. über die Serodiagnostik der malignen Geschwülste: Hara. Deutsche med. Wochenschr. (1914) Nr. 25.

²⁾ Siehe ferner über positive Resultate des Dialysierverfahrens bei Infektionskrankheiten: Voelkel, Münchener med. Wochenschr. (1914) 349.

³⁾ Aschner, Archiv f. Gynäkol. 102 (1914).

⁴⁾ Doyen und Takamine. Compt. rend. Soc. Biol. 77 (1914) Nr. 25.

⁵⁾ Babes und Jonesco, Ebenda 77 (1914) Nr. 22.

⁶⁾ Lampé, Münchener med. Wochenschr. (1914) 463.

⁷⁾ C. J. und M. Pachon, Compt. rend. Soc. Biol. 76 (1914) Nr. 14.

einhergeht. Wenn sich die Spezifität der Abwehrfermente hier bestätigt, trotz den Angaben, wo Fälle, die auf Dysfunktion endokriner Drüsen untersucht worden waren, zu vieldeutigen Resultaten bei der Abderhaldenschen Reaktion geführt haben¹⁾, so würde dies wohl einen wichtigen Schritt vorwärts in der Aufklärung verschiedener noch rätselvoller Krankheitsbilder, wie z. B. des „Diabète bronze“ und des Mongolismus bieten, die man geneigt sein könnte, als indirekte Ausfallserscheinungen zu betrachten. Bei Erkrankung der Thyreoidea, der Nebenniere oder des Pankreas werden zwar die beobachteten Ausfallserscheinungen in der Regel direkt auf die Erkrankung der betreffenden Drüse hinweisen. Es ist aber auch der Fall denkbar, daß sich die sekundären Störungen früher bemerkbar machen als die primären, namentlich dann, wenn die sekundären Ausfallserscheinungen einen akut in die Erscheinung tretenden, die primären einen mehr chronischen Charakter tragen, wodurch dann ein Symptomenkomplex ausgelöst werden kann, der den direkten Ausfallserscheinungen einer anderen Drüse mit innerer Sekretion entspricht. Da diese Drüse aber zunächst nur in ihrer Tätigkeit eine Steigerung oder Abschwächung durch die erkrankte andere Drüse erfahren wird, ohne selbst irgendwelche Degenerationserscheinungen aufzuweisen, so kann der eigentliche Urheber der Krankheitserscheinungen gerade in dem für die Heilung wichtigsten Anfangsstadium der Feststellung entgehen. Das im *Allgemeinen Teil* erwähnte Hormondreieck, welches die normalen Wechselwirkungen der Thyreoidea, Nebenniere und Pankreasdrüse zur Darstellung bringt, läßt zugleich für pathologische Fälle die nachfolgenden Möglichkeiten zur Hervorrufung indirekter Ausfallserscheinungen voraussehen:

1. Erkrankung der Thyreoidea, begleitet von

a) Hyposekretion,

b) Hypersekretion.

ad a) Da die Schilddrüse normalerweise negative Hormone gegenüber der Pankreasdrüse, positive dagegen gegenüber der Nebenniere an den Organismus abgibt, so ist die Hyposekretion der Thyreoidea begleitet von einer Zunahme der inneren Sekretion der Pankreasdrüse und von einer Abnahme der inneren Sekretion der Nebenniere. Letzteres könnte also indirekt zu einem Addisonischen Krankheitsbild führen, um so mehr als die gesteigerte innere Sekretion der Pankreasdrüse, welche letztere Hormone abgibt, die die Nebennierensekretion hemmen, in demselben Sinne wirkt. Trotzdem wäre nicht die Nebenniere, sondern die Schilddrüse primär erkrankt, aber noch nicht so weitgehend alteriert, daß die direkten Ausfallserscheinungen (Kretinismus, Myxödem, thyreoprive Kachexie) sich geltend machen.

ad b) Die Hypersekretion der Schilddrüse ist umgekehrt begleitet von einer Zunahme der inneren Sekretion der Nebenniere und einer Abnahme der inneren Sekretion der Pankreasdrüse, wodurch ein indirekter Pankreasdiabetes erzeugt werden kann, der viel prägnanter in die Erscheinung tritt als das direkt hervorgerufene Basedowsche Krankheitsbild. Manche ihrer Genese nach dunkle Diabetesfälle dürften in diese Kategorie gehören und ihre therapeutische Beeinflussung hätte in erster Linie an der hyperseziernden Thyreoidea anzusetzen.

¹⁾ Vgl. die Befunde von Rominger, Deutsche med. Wochenschr. (1914) 1451, über die mangelnde Übereinstimmung der Resultate bei wiederholter Prüfung der Sera von 28 rhachitischen und 19 rhachitisfreien Kindern.

2. Erkrankung der Pankreasdrüse.

- a) Hyposekretion,
- b) Hypersekretion.

ad a) Da die Pankreasdrüse normalerweise negative Hormone gegenüber der Thyreoidea wie der Nebenniere abgibt, so bewirkt die Hyposekretion derselben eine vermehrte innere Sekretion der Schilddrüse wie der Nebenniere. Es könnte daher zum Symptomenbild der Basedowschen Krankheit kommen, da auch die gesteigerte Nebennierensekretion auf eine Zunahme der inneren Sekretion der Schilddrüse hinwirkt. Trotz der theoretischen Möglichkeit wird dieser Fall jedoch praktisch kaum eintreten, da hier die direkten Ausfallserscheinungen, die zu dem sehr prägnanten Pankreasdiabetes führen, viel zu akuten Charakter besitzen, als daß sich ein chronisches Krankheitsbild wie Basedow daneben entwickeln könnte.

ad b) Die Hypersekretion der Pankreasdrüse verringert durch die gesteigerte Abgabe ihrer die Sekretion der Nebenniere und Schilddrüse hemmenden Hormone die innersekretorische Tätigkeit dieser Drüsen, wodurch indirekt das Addisonische Krankheitsbild wie die Folgewirkungen der Hyposekretion der Schilddrüse ausgelöst werden können.

3. Erkrankung der Nebenniere.

- a) Hyposekretion. Dieselbe läßt indirekte Ausfallserscheinungen der Schilddrüse (Myxödem, Mongolismus?¹⁾ usw.) erwarten.
- b) Hypersekretion.

Die Nebenniere gibt normalerweise positive Hormone an die Thyreoidea, negative an die Pankreasdrüse ab. Folglich bedingt ihre Hypersekretion eine gesteigerte Drüsentätigkeit der Thyreoidea und eine herabgesetzte des Pankreas, wodurch sowohl ein indirekter Basedow, wie ein indirekter Pankreasdiabetes erzeugt werden könnte. Namentlich der letztere kann sich bei dessen akutem Charakter frühzeitig geltend machen.

In all den genannten Fällen müssen sich also, bei einer Spezifität der Abwehrfermente gegen die erkrankten Drüsen mit innerer Sekretion, in bezug auf die Genese solcher Krankheiten, wie diagnostisch und therapeutisch die weitesten Perspektiven eröffnen. Gerade hier ist aber leider mit zahlreichen Störungsquellen zu rechnen, insbesondere damit, daß bei Erkrankung einer Drüse mehr noch als bei irgend einer anderen Körperzelle nicht nur deren Eiweißkörper, sondern auch deren spezifische Fermente in die Blutbahn gelangen, die dann neben den Abwehrfermenten, die sich gegen die spezifischen Eiweißkörper, die im Blute kreisen, ausbilden, vorhanden sein müssen. Nach Pincussohn (loc. cit. im folgenden) wären es überhaupt nur die bei Erkrankung von Organen freiwerdenden Zellfermente, welche das spezifische Organeiweiß abbauen, eine Auffassung, der jedoch schon deswegen keine allgemeine Gültigkeit zugeschrieben werden kann, weil ungeformtes Eiweiß irgendwelcher Provenienz, abgetötetes Bakterienmaterial, Kohlenhydrate usw. ebenfalls die Veranlassung einer Bildung spezifisch auf dasselbe

¹⁾ Das neben äußeren durch den Namen gekennzeichneten Erscheinungsmerkmalen mit Kretinismus einhergehende Krankheitsbild läßt sich im Gegensatz zum Myxödem durch Schilddrüsenfütterung, oder -implantation nicht beeinflussen. Hier wäre zu prüfen, ob nicht eventuell eine analoge Applikation von Nebennierensubstanz günstig wirken würde.

eingestellter Fermente im Blut der damit behandelten Individuen sind. Trotzdem werden natürlich die Eigenfermente der Körperzellen oder irgend eines Materials, das über Eigenfermente verfügt, zu berücksichtigen sein. Wenn die nativen Eiweißkörper oder daraus dargestellte Peptone, z. B. der erwähnten Drüsen, mit dem betreffenden Patientenserum in Berührung gebracht werden, so ist daher zu erwarten, daß sie dem doppelten Einfluß: den ursprünglich vorhandenen Drüsenfermenten und den neugebildeten, spezifisch auf die Drüseneiweißkörper eingestellten Abwehrfermenten unterliegen, wobei außerdem noch Wechselwirkungen der beiden Fermentgruppen untereinander in Betracht zu ziehen sind. Auch beim Eindringen lebender Bakterien usw. liegen ähnlich komplizierte Verhältnisse vor.

Dies dürfte z. B. bei den Befunden von Abwehrfermenten gegen Tuberkelbazillen im Blut von Lungenkranken zutreffen. So fanden M. Wolff u. K. Frank¹⁾, daß die leichten Fälle, bei denen lebende Tuberkelbazillen im Blut zwar ausgeschlossen sind, bei denen aber Bakterienleibessubstanz, die abgestorbenen Bakterien entstammt oder auch von den Bakterien abgesonderte Stoffe ins Blut gelangen und zur Bildung von Abwehrfermenten die Veranlassung sein können, Bazillenabbau im Serum erkennen ließen, und auch von anderer Seite²⁾ sind im Blutserum von Tuberkulösen Abwehrfermente mittels des Dialysierverfahrens nachgewiesen worden, welche eine Tuberkelbazillenemulsion abbauten³⁾. Die schweren Fälle zeigten dagegen, entsprechend der fortgeschrittenen Schädigung des Lungengewebes, eine Abbaufähigkeit des Serums gegenüber diesem Organ. Bisweilen blieb aber der Abbau von beidem aus. Andererseits baute häufig auch normales Serum Bazillen, wie Lungengewebe ab, was die Verfasser gegen das Vorhandensein spezifischer Abwehrfermente ins Feld führten. Doch besagt der letztere Befund nichts anderes, als was sich auch aus den positiven Tuberkulinreaktionen von 70—90 % (je nach der Empfindlichkeit der verwendeten Tuberkulinreaktion) der nicht an manifester Tuberkulose leidenden Individuen ergibt. Es würde sich lediglich darum handeln, daß das betreffende positiv reagierende Individuum irgend einmal mit dem Tuberkulosevirus in Berührung gekommen ist, die Infektion aber überwunden hat. Diese Auffassung verlangte nur ein viel längeres Kreisen der Abwehrfermente im Blut, als gemeinhin angenommen wird.

Unter so komplizierten Verhältnissen ist es begreiflich, daß die Organ-

¹⁾ M. Wolff und Frank, Berliner klin. Wochenschr. (1914) Nr. 19.

²⁾ Siehe Nelikjanz, Deutsche med. Wochenschr. (1914) Nr. 27.

³⁾ Erwähnt sei ferner, daß nach Epilrand, Pensiero med. 3 (1914) 801; Lenk u. Pollak, sowie Mandelbaum, Münchener med. Wochenschr. (1914) 461, das Serum, der Liquor cerebrospinalis, Exsudate und Transsudate, sowie tuberkulöse Punktionsflüssigkeiten, ein gegenüber normalen oder anderweitig kranken Individuen besonders erhöhtes, diagnostisch verwertbares peptolytisches Vermögen — gemessen an der Spaltung des Glyzylyryptophans — zeigen [siehe demgegenüber jedoch Saxl, Berliner klin. Wochenschr. (1914) Nr. 18, über den Abbau von Wittepepton durch alle geprüften Sera], was mit der Annahme (diese Seite) übereinstimmen würde, daß es Spaltprodukte der Bazillenleibessubstanz sind, gegen die sich bei Tuberkulose Abwehrfermente im Blut bilden. Auch nach dem Tode, mit welchem an und für sich eine enorme Steigerung der peptidabbauenden Fähigkeiten des Blutserums einhergeht, zeigen Tuberkulöse nach Mandelbaum Höchstwerte.

spezifität der Abwehrfermente¹⁾ nicht immer deutlich in die Erscheinung tritt und daher häufig bestritten worden ist. Die eine Spezifität in Abrede stellenden Arbeiten mögen, kurz zusammengefaßt, veranlaßt sein teils durch den „Hülsenfehler“²⁾, teils durch den noch wichtigeren „Organfehler“, d. h. den Mangel streng spezifischer Substrate³⁾, teils durch die erwähnten Komplikationen von seiten verdauender Enzyme, die aus erkrankten Körperzellen selbst in die Blutbahn gelangen⁴⁾, teils durch Aktivierung der normalen, unspezifischen Blutprotease oder auch durch die Zusammensetzung des natürlichen Milieus oder künstliche Zusätze, wie dies für den Zusatz eines Phosphatgemisches aus der Arbeit von Deetjen u. Fränkel⁵⁾, geschlossen werden kann. Diese Forscher fanden nämlich, daß bei Phosphatzusatz und Kochen im Salzwasserbad nahezu alle geprüften Organe eine positive Reaktion ergeben, was mit der Abspaltung von Glukosamin aus Bindegewebe und der Reaktion des Glukosamins mit Ninhydrin, welche Neuberg⁶⁾ aufgefunden hat, in Zusammenhang gebracht worden ist. Verunreinigung mit Bindegewebe dürfte also einen wesentlichen Anteil am Zustandekommen des „Organfehlers“, der mangelnden Spezifität des Substrates, tragen. Auch Nieszytka⁷⁾ hat neben der Resorptionsgeschwindigkeit die Reinheit des Antigens als wesentlich für die Spezifität erkannt. Ferner kann die nicht immer gleiche Wanddicke und eine ungleiche Qualität der Reagenzgläser bei der Ausführung der Ninhydrinreaktion durch Kochen über freier Flamme eine Fehlerquelle darstellen, die sich aber durch Ausführung der Ninhydrinprobe durch gleichzeitiges Einstellen aller Gläser des Hauptversuchs und der Kontrollen in ein siedendes Wasserbad leicht beheben ließe. Jedenfalls dürfte ganz allgemein — so wie dies vorhin für einen speziellen Fall ausgeführt worden ist — trotz all der zahlreichen, vielleicht nicht immer ganz zu vermeidenden Fehlerquellen und Komplikationen — die Spezifität der Abwehrfermente nicht anders zu beurteilen sein, als diejenige des „lytischen Immunkörpers“, wo trotz des Bestehens der unspezifischen normalen humoralen Protease, die sich gegen die verschiedensten Substrate richtet, die Existenz der ungleich viel wirksameren spezifisch eingestellten Protease, eben des lytischen Immunkörpers, außer Zweifel steht. Noch komplizierter liegen die Dinge, wenn Gemenge mehrerer Organe eingeführt werden. Es bilden sich dann nach Kafka u. Pförringer⁸⁾ Abwehrfermente gegen alle einverlebten Organe, und nur gegen diese aus, wobei die Tierart, von der das Organ stammt, gleichgültig zu sein scheint.

¹⁾ Für die Organe, die der proteolytischen Abwehrfermente sind außer Abderhalden selbst und seinen Mitarbeitern zahlreiche Forscher eingetreten; siehe z. B. A. Fuchs, Münchener med. Wochenschr. (1913) Nr. 40; Lampé, Ebenda (1914) 463; Lampé u. Fuchs, Deutsche med. Wochenschr. (1914) 747; siehe auch Nelikjanz, Wiener klin. Wochenschr. (1914) Nr. 29 und loc. cit. vorige Seite, Fußnote 2; Decio, Il Policlin. 20 (1914) 1231.

²⁾ Siehe z. B. Kämmerer, Clausz u. Dieterich, Münchener med. Wochenschr. (1914) 469; Flatow, Ebenda (1914) 463.

³⁾ Abderhalden, Ebenda (1914) 1897.

⁴⁾ Pincussohn, Berliner klin. Wochenschr. (1914) 224.

⁵⁾ Deetjen und Fränkel, Münchener med. Wochenschr. (1914) 466.

⁶⁾ Neuberg, Biochem. Zeitschr. (1913) 500.

⁷⁾ Nieszytka, Deutsche med. Wochenschr. (1914) Nr. 30.

⁸⁾ Kafka und Pförringer, Deutsche med. Wochenschr. (1914) 1255.

während sich die noch problematische, von Wegener (loc. cit.) und Lampé (loc. cit.) beobachtete, von Heilner u. Petri¹⁾ dagegen abgelehnte Geschlechtsspezifität geltend machen soll.

Ohne Berücksichtigung der erwähnten, vornehmlich durch den zweifachen Charakter der in Frage kommenden Fermente bedingten Komplikationen würde sich die Ausführung der Methode in den beiden praktisch wichtigsten und best erprobten Fällen, wie im folgenden angegeben, gestalten:

Chemische Nachweismethoden des Eiweißabbaus am Dialysat²⁾.

Dieselbe gründet sich auf die schon anlässlich der Besprechung der Proteasenermittlung im Magendarmkanal angeführte Kombination des Systems Protease + Eiweiß mit einer dialytischen Vorrichtung, durch welche die kristalloiden Verdauungsprodukte vom kolloiden Ausgangsmaterial getrennt werden können. In dem vorliegenden Fall würde es sich um das auf Abwehrfermente zu prüfende Serum + demjenigen Eiweiß handeln, welches die Veranlassung zur Bildung der Abwehrfermente gewesen ist, also um Serum von Krebskranken + Tumorgewebe, oder um Serum von Graviden + Plazentaeiweiß, oder um

¹⁾ Heilner und Petri, Münchener med. Wochenschr. (1913) Nr. 28 [siehe auch den sich auf diese Befunde zum Teil stützenden ablehnenden Standpunkt in der Spezifitätsfrage, den Singer, Ebenda (1914) 350 einnimmt].

²⁾ Abderhalden, loc. cit.; siehe ferner Derselbe, Zeitschr. f. physiol. Chem. 81 (1912) 90; Münchener med. Wochenschr. 40 (1912), (1913) Nr. 8, (1914) 233, 401 (Replik an Oeller u. Stephan, loc. cit. diese Fußnote); Berliner tierärztl. Wochenschr. (1912) Nr. 42; Deutsche med. Wochenschr. (1912) Nr. 46; Fauser, Ebenda (1913) Nr. 7; Jonas, Ebenda (1913) 1099; Lampé u. Papazolu, Münchener med. Wochenschr. (1913) u. Lampé, loc. cit.; Freund u. Brahm, Ebenda (1913) 685, (1914) 1664; Hegner, Ebenda (1913) 1138; Rüb-samen, Ebenda (1913) 1139, (1914) 1664; Schiff, Ebenda (1913) 1197; King, Ebenda (1913) 1198; Behne, Zentralbl. f. Gynäkol. (1913) Nr. 17; Gaifami. Bolletino della Reale Accad. med. di Roma 39 (1913) Nr. 3—4; Ferrari, Ligura med. 7 (1913) Nr. 5—6; Falk, Berliner tierärztl. Wochenschr. (1913) Nr. 8; Pregl, Fermentforschung 1 (1914) 7; Bronstein, Münchener med. Wochenschrift (1914) 74; de Waele, Ebenda (1914) 364; Plaut, Ebenda (1914) Nr. 5, 238; Berner, Ebenda (1914) Nr. 15; Mayer, Ebenda (1914) 67; Oeller u. Stephan, Ebenda (1914) 12, 75, 425; Nieden, Ebenda (1914) 2200; Mosbacher u. Port, Deutsche med. Wochenschr. (1914) 1410; Peiper, Ebenda (1914) Nr. 29; Guggenheimer, Zeitschr. f. Chemotherapie, II. Abteil. Ref. 3 (1914) Heft 2/3; P. Lange, Biochem. Zeitschr. 61 (1914) 194; Pregl u. de Crinis, Fermentforschung 2 (1917) 58 und andere Forscher.

Serum von Patienten, die irgendwelche Bakterien¹⁾ oder Protozoen²⁾ in ihrem Blut beherbergen + das betreffende Erregermaterial bzw. dessen spezifisches Eiweiß. Die gebildeten Verdauungsprodukte wandern dann auch hier durch die Dialysiermembran und geben sich im Dialysat durch ihre spezifischen Reaktionen zu erkennen, und zwar nicht nur die letzten Abbauprodukte des Eiweiß, die einfachsten Aminosäuren, sondern auch die Produkte einer partiellen Eiweißhydrolyse, die Peptone, die in ihrer Dialysierbarkeit die Mitte halten zwischen dem undialysablen nativen Eiweiß und den leicht dialysablen einfachsten Aminosäuren.

Für das Gelingen des Versuchs ist von größter Bedeutung die Beschaffenheit der Dialysiermembranen, die man in Form von Dialysierhülsen verwendet [Schlauchart Nr. 579 A³⁾ der Firma Schleicher und Schüll, Düren], in die das System Patientenserum + Eiweiß oder bei den Kontrollen Normalserum + Eiweiß allein eingebracht wird. Nicht nur zu große Durchlässigkeit und Schäden der Membran (durch welche natives Eiweiß in das Dialysat gelangen und hier Peptone vortäuschen könnte) oder umgekehrt eine zu große Dichtigkeit der Membran, [derzufolge die ohnehin nur mäßig diosmierbaren Peptone völlig zurückgehalten werden], sondern jede auch die geringste Differenz in der Durchlässigkeit der zu den Versuchen und Kontrollversuchen benutzten Dialysierhülsen kann Täuschungen in bezug auf die Bewertung der Ergebnisse veranlassen. Es muß daher der Verwendung von Dialysierhülsen zu den angegebenen Versuchen sowohl ihre Prüfung auf Undurchlässigkeit für natives Eiweiß, wie ihre Prüfung auf gleichmäßige Durchlässigkeit der Eiweißabbauprodukte vorausgeschickt werden („Eichung der Dialysierschläuche“⁴⁾).

Die Prüfung auf Undurchlässigkeit für Eiweiß erfolgt

¹⁾ Es ist dabei nicht unbedingt notwendig, daß sich die Bakterien selbst im Blut befinden, sondern lediglich denselben entstammende Stoffe.

²⁾ Die Malaria würde auch nach dieser Richtung ein besonders dankbares Feld für die Forschung bieten, der nur die schwer zu bewerkstellende Züchtung der Malariaplasmodien hindernd im Wege steht. Daß die regelmäßigen Fieberanfälle nicht nur mit dem Auftreten der Plasmodien im Blut, sondern namentlich mit dem Abbau dieses körperfremden Materials durch die Abwehrfermente des Plasmas zusammenhängen (Anaphylaxie), dürfte, wie mir scheint, außer Zweifel stehen.

³⁾ Zu lange Hülsen, die weit über das Niveau der Außenflüssigkeit hinausragen, würden eine ungleichmäßige Verdunstung des Dialysates bewirken, wodurch Konzentrationsdifferenzen zwischen Versuchen und Kontrollversuchen zustande kommen könnten, die natürlich die Resultate unbrauchbar machen würden.

⁴⁾ Abderhalden, Abwehrfermente, 2. Aufl., S. 134 ff.

in der Weise, daß die durch Einlegen in kaltes Wasser während einer halben Stunde aufgeweichten Hülsen in Erlenmeyerkölbchen gestellt und mit 2,5 ccm einer frisch hergestellten Albuminlösung beschickt werden, die aus 5 ccm frischem Eiereiweiß oder auch Blutserum + 95 ccm Wasser bereitet wird. Die Beschickung darf nur durch eine tief in die Hülse eingeführte Pipette mit größter Sorgfalt erfolgen, damit weder die Außenseite der Hülse, noch die Innenseite in der Nähe des Randes ¹⁾ mit der Pipette berührt und das Dialysat auf diesem Wege direkt oder indirekt verunreinigt wird. Zur Sicherheit empfiehlt Abderhalden nach erfolgter Beschickung zunächst eine Abspülung der Außenseite der oben mit Daumen und Zeigefinger ²⁾ verschlossenen Hülsen im fließenden Wasser und hierauf das Ausspülen des oberen (über das Dialysat hinausragenden) Teils der Innenfläche der in der Mitte mit den Fingern verschlossenen Hülse, wobei das Spülwasser durch Bewegung der die Hülse verschließenden Finger gegen das freie Ende herausbefördert wird. Die Hülsen werden nun in frische, je 20 ccm sterilisiertes, destilliertes Wasser enthaltende, die Hülsen ganz in sich aufnehmende, numerierte Erlenmeyerkölbchen gebracht, sowohl auf den Hülseninhalt, wie auf die Außenflüssigkeit ungefähr $\frac{1}{2}$ ccm Toluol geschichtet und die Kölbchen, mit Uhrgläsern bedeckt, oder verschlossen in einem ausschließlich für die Untersuchungen auf Abwehrfermente reservierten Thermostaten (Brutschrank) ungefähr 16 Stunden der Dialyse überlassen. Hierauf werden je 10 ccm der Dialysate in entsprechend numerierte Reagenzgläser mit besonderen, völlig reinen Pipetten übertragen, zu jeder Probe 2,5 ccm 33 %ige Natronlauge gesetzt, durch Hin- und Herbewegen des Reagenzglases vermischt und mit je 1 ccm einer Kupfersulfatlösung in der ungefähren Verdünnung 1:500 sorgfältig überschichtet. Die geringste mit Violett bis Rosafärbung sich zu erkennen gebende Biuretreaktion zeigt, daß die Hülse, welche das betreffende Dialysat geliefert hat, unbrauchbar ist. Die übrigen, auf Grund des negativen Ausfalls der Biuretreaktion am Dialysat in bezug auf die fehlende Durchlässigkeit für Eiweiß als brauchbar befundenen Hülsen werden ausgegossen, auf ein Sieb gebracht, $\frac{1}{2}$ Stunde mit fließendem Wasser behandelt und höchstens $\frac{1}{2}$ Minute in siedendes Wasser gelegt.

Die Prüfung auf gleichmäßige Durchlässigkeit der

¹⁾ Hier könnte das Eiweiß eintrocknen und durch Verstäuben das Dialysat verunreinigen.

²⁾ Natürlich müssen die Hände zuvor peinlichst gereinigt oder geeignete Pinzetten verwendet werden.

Eiweißabbauprodukte erfolgt an den in der beschriebenen Weise behandelten Hülsen, indem man sie mit 2,5 ccm einer 1%igen Lösung von Seidenpepton beschickt und sorgfältig mit Wasser abspült. Hierauf wird gleich wie bei der Prüfung auf Undurchlässigkeit für Eiweiß weiter verfahren, mit dem einen Unterschied, daß die Prüfung des Dialysats mit Ninhydrin (Triketohydrindenhydrat¹⁾ erfolgt, welches als Reagens auf die Karboxyl- und Aminogruppe (α -ständig) in dem Maß stärker reagiert, als diese Gruppen in höheren Konzentrationen vorhanden sind. Alles was diese Konzentration vermehrt, erhöht also in entsprechender Weise den Grad der beim Kochen eintretenden Blaufärbung²⁾ und umgekehrt. Infolgedessen muß das Dialysat durch viel Toluol vor dem Eindunsten geschützt und das Kochen der Proben genau in derselben Weise und gleich lang ausgeführt werden. Auch muß jede Verunreinigung mit Stoffen, welche mit Ninhydrin reagieren, (wie Schweiß, Epidermisschuppen durch Berührung der Dialysierhülsen mit den Händen statt mit ausgekochten, völlig trockenen Pinzetten) vermieden werden. Ferner müssen natürlich die zum Abmessen des Dialysats verwendeten Pipetten und die zur Aufnahme der Dialysatproben bestimmten Reagenzgläser völlig rein und trocken sein. Die Pipetten müssen mit dem Finger verschlossen in die Dialysate eingeführt werden, damit beim Passieren der Toluolschicht nichts davon aufgenommen wird.

10 ccm eines jeden Dialysats, die also mit besonderen Pipetten in die entsprechenden, bei 10 ccm mit einer Marke versehenen Reagenzgläser eingeführt werden müssen, werden nun mit je 0,2 ccm einer frischen, genau 1%igen wäßrigen Ninhydrinlösung versetzt und zu jeder Probe ein 10 cm langes, mit destilliertem Wasser ausgekochtes, im Brutschrank getrocknetes Siedestäbchen³⁾ mittels einer Pinzette hinzugefügt. Dann wird Probe um Probe in der Weise gekocht, daß die Reagenzgläser in die Mitte einer hochbrennenden Bunsenflamme gehalten und vom Moment des nach wenigen Sekunden beobachteten Auftretens der ersten Gasblasen an der Glaswandung gerechnet, genau 1 Minute gekocht werden. Mit dem Eintreten des lebhaften Siedens, nach 10—15 Sekunden, wird die Flammenhöhe auf die Hälfte erniedrigt und nach Ueberführung des Reagenzglases in die Randzone

¹⁾ Abderhalden u. Schmidt, Zeitschr. f. physiol. Chem. 85 (1913) 143.

²⁾ An Stelle des kolorimetrischen Vergleichs hat Herzfeld, Biochem. Zeitschr. 59 (1914) 249, 68 (1915) 402, die spektrophotometrische Bestimmung empfohlen.

³⁾ Die ausgekochten und getrockneten Stäbchen werden in sehr gut schließenden Glasgefäßen aufbewahrt.

der Flamme der Inhalt weiter im Kochen erhalten. Mit Rücksicht auf die schon angeführten, schwer ganz auszuschaltenden Ungleichheiten der Reagenzgläser, was die Dicke der Glaswandungen und vielleicht auch die Qualität des Glases anbetrifft, würde es sich empfehlen, das Erhitzen nicht über der freien Flamme, sondern durch gleichzeitiges Einstellen der Reagenzgläser in ein siedendes Wasserbad vorzunehmen. Nach einer halben Stunde wird die Farbintensität in den einzelnen Proben verglichen und nur diejenigen Hülsen als brauchbar für die Versuche zurückbehalten, die Dialysate von gleicher Färbung ergeben. Diese Hülsen werden wiederum gründlich ausgewaschen, $\frac{1}{2}$ Minute in kochendes Wasser verbracht und in einer sterilisierten Flasche unter gleiche Mengen Toluol und Chloroform enthaltendem sterilisiertem Wasser¹⁾ bis zum Gebrauch aufbewahrt. Im Gebrauch befindliche Hülsen müssen alle Monate erneut geprüft werden, wenn nicht schon früher fehlerhafte Resultate die Prüfung der Hülsen notwendig machen.

Die Zubereitung des zur Verwendung kommenden Organs. Nicht minder große Aufmerksamkeit als die Dialysierhülsen verlangt die Zubereitung des zur Verwendung kommenden Organ- oder sonstigen Eiweißes, das auf einen Abbau durch die gegen dasselbe gerichteten Abwehrfermente geprüft werden soll²⁾. Die Plazenta oder irgend ein anderes Organ³⁾, dessen Zustand normal oder anderenfalls zum mindesten genau beschrieben sein soll⁴⁾, muß sowohl absolut frei von irgendwelchen die Ninhydrinreaktion gebenden Stoffen wie von Blut sein, letzteres aus dem Grunde, weil sehr oft bluthaltige Organe, sei es infolge von aus den Blutkörperchen stammenden Proteasen⁵⁾ bzw. thermostabilen Komponenten derselben (Ambozeptoren) oder umgekehrt von gegen Blutkörperchenbestandteile im Blut gebildeten Abwehrfermenten⁶⁾, auch mit normalem Serum eine positive Reaktion ergeben.

¹⁾ Die Flasche muß mit dem sterilen Wasser vollständig gefüllt werden.

²⁾ Siehe auch Lampé, Zur Technik der Bereitung der Organe für das Abderhaldensche Dialysierverfahren, Münchener med. Wochenschr. (1918) Nr. 51.

³⁾ Bei besonders an Lipoiden oder auch an anderen Fettstoffen reichen Organen oder Bakterien (Leprabac., Tuberkelbac.) müssen dieselben zunächst mit Tetrachlorkohlenstoff im Soxhletapparat der Extraktion unterworfen werden.

⁴⁾ Leichenorgane können nur bei rasch erfolgtem Tod (am besten von Verunglückten) verwendet werden.

⁵⁾ Ueber Polypeptidspaltung durch Blutkörperchen siehe Abderhalden u. Deetjen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51 (1907) 334, 53 (1907) 280; Abderhalden u. Manwaring, Ebenda 55 (1908) 377.

⁶⁾ Abderhalden, Abwehrfermente, 2. Aufl., S. 170.

Nach mechanischer Entfernung der Blutgerinnsel werden die Organe in Stücke oder Scheiben von ca. 1½ cm Durchmesser zerschnitten oder eventuell bei Karzinom sehr fein zerhackt. Das Material wird dann auf einem Sieb ununterbrochen im fließenden Leitungswasser mit der Hand einzeln ausgedrückt und von Zeit zu Zeit in einem Tuch ausgepreßt¹⁾. Durch Zerdrücken in einer Reibschale mit dem Pistill werden die letzten Blutreste und eventuell auch Bindegewebe entfernt. Danach wird das rein weiße Gewebe sofort durch Einbringen in etwa die 100fache Menge siedendes destilliertes Wasser (mit einem geringen Essigsäurezusatz)²⁾ während 10 Minuten gekocht, eventuell zentrifugiert, das Kochwasser durch ein Sieb abgessen und das wie angegeben behandelte, koagulierte Organeiweiß ungefähr 5 Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Die ganze Prozedur wird mindestens 5mal mit frischem, nunmehr säurefreiem Wasser durchgeführt, und zwar wegen der Infektionsgefahr des Gewebes in ununterbrochener Aufeinanderfolge. Danach wird nochmals mit der höchstens 5fachen Wassermenge 5 Minuten lang stark gekocht und durch gehärtete Filter abfiltrierte Proben von je 5 ccm mit mindestens je 1 ccm der 1%igen wäßrigen Ninhydrinlösung in der angegebenen Weise erhitzt. Fällt die Ninhydrinreaktion noch positiv aus, so muß weiter bis zu deren Verschwinden ausgekocht werden; ist sie negativ, so ist dagegen das Organ gebrauchsfertig und wird in einer sterilisierten Flasche mit eingeschliffenem, bis in die Flüssigkeit hineinragenden Stopfen unter wenig sterilisiertem Wasser und viel Chloroform und Toluol im Eisschrank aufbewahrt. Nach Entnahme von Organteilen, die mit steriler Pinzette zu erfolgen hat, dürfen unverbrauchte Reste nicht wieder zurückgegeben werden. Vor der Verwendung hat man sich noch davon zu überzeugen, daß das Organ durch andere Sera als diejenigen, welche die spezifischen Abwehrfermente enthalten, nicht angegriffen wird, so z. B. Plazenta nicht durch Serum von Karzinomatösen, Tuberkulösen usw., und Karzinomgewebe nicht durch Serum von Graviden. Auch beim Hauptversuch sind gleichzeitig immer derartige Kontrollversuche anzustellen.

Gewinnung und Vorbehandlung des Serums. Endlich muß auch dem zur Verwendung kommenden Serum größte Aufmerksamkeit geschenkt werden. Durch Entnahme des Blutes in nüchternem Zustand läßt sich der Bedingung größtmöglicher Armut an dia-

¹⁾ Schwer von geronnenem Blut zu reinigende Stücke werden entfernt.

²⁾ Pro Liter Wasser 5 Tropfen Eisessig.

lysabeln, die Ninhydrinreaktion gebenden Stoffen ¹⁾ genügen. Das steril, mit absolut trockener Nadel entnommene Blut wird der spontanen Gerinnung überlassen. Hämolytische, schon durch ihre rötliche (durch den ausgetretenen Blutfarbstoff verursachte) Färbung ²⁾ erkennbare Sera sind ebenso unbrauchbar wie solche, die noch irgendwelche Formelemente enthalten. Die Sera müssen dann durch zweimaliges, 5—10 Minuten währendes Zentrifugieren mit einer elektrischen Zentrifuge von hoher Tourenzahl von allen Formelementen befreit sein, damit nicht durch die Dialyse, in dem Maß als sich infolge des Herausschlebens der Salze eine hypotonische Lösung bildet, der Versuch wegen der einsetzenden Hämolyse zu unrichtigen Resultaten führt.

Der Hauptversuch selbst ist bei guter natürlicher Beleuchtung unter allen Kautelen der Asepsis und den bei den Vorprüfungen eingehend beschriebenen Vorsichtsmaßregeln in bezug auf absolute Reinheit und Trockenheit der Gefäße und sämtlichen zur Verwendung kommenden Utensilien durchzuführen. Hat man sich nach erfolgter Blutentnahme durch Kochen des Gewebestückchens, das zur Verwendung kommen soll, mit der höchstens 5fachen Menge Wasser im Reagenzglas während 5 Minuten und Filtrieren des Kochwassers durch ein gehärtetes Filter, an 5 ccm des Filtrats durch Kochen mit 1 ccm der 1%igen Ninhydrinlösung in der angegebenen Weise davon überzeugt, daß jede Spur einer Violettfärbung ausbleibt, so werden je 0,5 g des mit Pinzetten zerzupften Organs in die erforderliche Zahl geprüfter, in leeren, trockenen Erlenmeyerkölbchen befindlichen Dialysierhülsen verbracht und je 1,5 ccm Serum zu diesen mit dem Organ beschickten Hülsen und in eine Anzahl leere Hülsen (Serumkontrollen) ³⁾ übertragen ⁴⁾. Hierauf werden alle Hülsen, wie angeführt, sorgfältigst

¹⁾ Ueber den Einfluß der Ermüdung auf den Gehalt des Blutserums an dialysierbaren, mit Triketohydrindenhydrat reagierenden Verbindungen siehe Abderhalden u. Lampé, Zeitschr. f. physiol. Chem. 85 (1913) 136.

²⁾ Auf alle Fälle läßt sich vorhandener Blutfarbstoff spektroskopisch erkennen, sowie durch das Erhaltenbleiben der Peroxydasereaktionen (s. das letzte Kapitel) auch nach dem Aufkochen.

³⁾ Bei Bakterien usw., deren Nährboden nicht entfernt werden kann, muß außerdem eine Kontrolle Serum + Nährboden (keimfrei) angesetzt werden; auch darf der keimfreie Nährboden nur nach so langem Auskochen mit Wasser verwendet werden, bis das filtrierte Kochwasser nicht mehr mit Ninhydrin reagiert.

⁴⁾ Statt mit Serum allein kann auch eine Kontrolle mit einem durch halbstündiges Erhitzen auf 60° inaktivierten Serum + Organ angesetzt werden. Es hat dies den Vorteil, daß dadurch auf die Summationswirkung von die Ninhydrinreaktion gebenden Stoffen, die dem Serum, und solchen, die einem eventuell nicht genügend lang ausgekochten Organ entstammen, geprüft wird.

abgespült, in frische, mit 20 ccm sterilisiertem destilliertem Wasser versehene, numerierte Erlenmeyerkölbchen verbracht und in die Hülsen sowie auf die Außenflüssigkeit viel Toluol geschichtet¹⁾, wobei auch der die Flüssigkeit überragende Teil der Hülsen mit Toluol getränkt werden soll. Dann werden die Kölbchen 16 Stunden im besonderen Thermostaten bei 37° der Dialyse überlassen. Nun werden in allen Einzelheiten, so wie dies früher beschrieben worden ist, 10 ccm eines jeden Dialysates in numerierte, weite, trockene, absolut reine Reagenzgläser gebracht und jede Probe mit 0,2 ccm der 1%igen wäßrigen Ninhydrinlösung²⁾, wie bei der Vorprobe angegeben, gekocht und nach 1/2stündigem Stehen notiert, in welchen Gläschen im durchfallenden und auffallenden Licht eine Violettfärbung eingetreten ist. Das Resultat ist nur dann als positiv zu verwerten, wenn in den betreffenden Gläschen nicht durch fehlerhaftes Kochen eine stärkere Eindunstung stattgefunden hat. Beim gleichzeitigen Erhitzen aller Gläschen im siedenden Wasserbad kommt diese Fehlerquelle nicht in Betracht. Ist bei völlig gleicher Eindunstung z. B. in den Gläschen, welche Dialysat von Serum + Organ enthalten, eine Violettfärbung eingetreten, nicht aber in den Dialysaten der Serumkontrollen, so würde dies also bedeuten, daß das betreffende Serum Abwehrfermente gegen das hinzugefügte Organeiweiß enthält. Handelt es sich um Plazentaeiweiß, so wäre demnach die Frage, ob in dem betreffenden Fall Gravidität besteht, zu bejahen. Sie wäre es auch, wenn bei einem positiven Ausfall der mit Serum allein angesetzten Kontrollen dennoch ausgesprochene Farbendifferenzen im Sinne eines stärkeren Ausfalls der Serum-Organproben gegenüber den Serumkontrollen bestehen. Bei kleinen quantitativen Unterschieden müssen jedoch nochmals Proben und Kontrollproben mit weniger Serum angesetzt werden. Die letzteren werden dann mit der durch die geringere Serummenge bedingten Konzentrationsverminderung der vom Serum allein an das Dialysat abgegebenen, mit Ninhydrin reaktionsfähigen Stoffen unter die Empfindlichkeitsgrenze dieser Reaktion herabgedrückt, während das Plus an derartigen Stoffen, welche infolge des Angriffs des Organeiweißes bei den Organ-

¹⁾ Dabei muß peinlichst beachtet werden, daß nichts von dem frischen in die Hülsen verbrachten Gewebe an Teilen der Hülse hängen geblieben ist, die über das Serum oder gar über die Toluolschicht hinausragen.

²⁾ Ueber die Anwendung der Ninhydrinreaktion siehe ferner Abderhalden u. Hubert Schmidt, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 72 (1911) 37; Dieselben, *Ebenda* 85 (1913) 143; Schlimpert u. Hendry, *Münchener med. Wochenschr.* (1913) Nr. 13; Deetjen u. Fränkel, *Ebenda* (1914) Nr. 9, 466. sowie die das Dialysierverfahren betreffenden Arbeiten (loc. cit.).

+ Serumproben in das Dialysat gelangen, hinreicht, um einen positiven Ausfall zu veranlassen.

Statt mit Hilfe der Ninhydrinreaktion können die Dialysate auch mittels der Biuretreaktion in der Weise geprüft werden, daß die jeder Probe entnommenen 10 ccm mit 2,5 ccm 33%iger Natronlauge versetzt werden, worauf man mit sehr verdünnter Kupfersulfatlösung überschichtet. Ein violetter bis rötlicher Ring verrät dann die Anwesenheit von albumose-peptonartigen Eiweißabbaustufen.

Was empfehlenswerter ist: die Ninhydrin- oder die Biuretreaktion hängt außer von der subjektiven Empfindlichkeit gegenüber der letztgenannten auch davon ab, ob bei einem bestimmten Abwehrferment vorwiegend höhere oder tiefere Abbaustufen unter den in Frage kommenden Bedingungen gebildet werden, da die Biuretreaktion mit dem Grad des Abbaus abnimmt und mit dem vollständigen oder nahezu vollständigen Uebergang in die einfachen kristallinen Spaltprodukte völlig negativ wird, während umgekehrt die freie Karboxyl- und Aminogruppen anzeigende Ninhydrinreaktion eine sukzessive Zunahme mit dem Grad der Eiweißhydrolyse ergibt. Bei farbenempfindlichen Untersuchern und relativ wenig weitgehendem Eiweißabbau ist die Biuretreaktion aus dem Grund besonders zu empfehlen, weil das Serum allein überhaupt keine die Biuretreaktion gebenden Stoffe an das Dialysat abgibt und das Kochwasser der Organe viel eher die Biuretreaktion als die Ninhydrinreaktion verliert. Ein positiver Ausfall der Biuretreaktion am Dialysat einer Serum- + Organprobe ist also auch ohne Serumkontrolle für eine proteolytische Wirkung gegenüber dem Organ beweisend. Wenn irgend möglich sollten Ninhydrin- wie Biuretreaktion als einander in gewissem Sinne ergänzende Proben am selben Dialysat ausgeführt werden. Erstere verfolgt die Gesamtsplaltung, und zwar vorwiegend deren peptische Phase, während die letztere Probe nur der ersten Phase des Eiweißabbaus, der Pepsinasewirkung, entspricht.

Im Anschluß an das Dialysierverfahren sei auch die von Pregl und de Crinis¹⁾ für den Nachweis von Abwehrfermenten in kleinsten Serumengen eingeführte Modifikation — die Mikro-Abderhaldenreaktion²⁾ — angeführt, die auf eine Mikrostickstoff- und Aminostickstoffbestimmung hinausläuft.

¹⁾ Pregl u. de Crinis, *Fermentforschung* 2 (1917) 58.

²⁾ Siehe z. B. Abderhalden, *Münchener med. Wochenschr.* (1914) 1897.

Physikalisch-chemische Nachweismethoden des Eiweißabbaus.

Es ist zu erwarten, daß, wie die biologischen und chemischen Verfahren [unter denen außer den im vorigen eingehend beschriebenen auch eine der Grütznerschen Pepsinermittlungsmethode (loc. cit.) mit Karminfibrin analoge, sowie die mikroskopische Beobachtung an gefärbten Schnitten vor und nach der Einwirkung des Serums von Abderhalden für den Nachweis der Abwehrfermente empfohlen worden ist], die verschiedenen früher besprochenen physikalisch-chemischen Methoden für die Proteasebestimmung in die Praxis der Abwehrfermentuntersuchung Eingang finden.

Da mit der Eiweißspaltung eine Vermehrung der Zahl der Moleküle stattfindet und, speziell bei der tiefergreifenden Spaltung die Zahl der ionisierten Moleküle, eine Zunahme erfährt, so ist an die Anwendung von Gefrierpunktserniedrigung und Leitfähigkeitsbestimmung zu denken, namentlich an die letztere, besonders empfindliche Methode. Ebenso kämen Aenderungen der Viskosität und der Oberflächenspannung (Stalagmometrie) in Betracht. Die letztgenannte Methode würde ungefähr dem entsprechen, was die Immunitätswissenschaft als Meio-stagminreaktion ¹⁾ in Anwendung bringt. Die übrigen eben genannten Methoden harren jedoch erst noch ihrer Ausarbeitung. Dagegen haben die optischen Methoden eine um so eingehendere Bearbeitung erfahren.

Die Polarimetrie wurde von Abderhalden ²⁾ selbst zu diesem Zweck als sehr geeignet empfohlen. Die polarimetrische Methode ergänzt das Dialysierverfahren dadurch, daß bei der Prüfung auf die-

¹⁾ Siehe im vorigen.

²⁾ Ueber diese Methode siehe Abderhalden, Med. Klinik (1909) Nr. 41; Zentralblatt f. Physiol. 23, Nr. 25; Handbuch d. biochem. Arbeitsmethoden 5 (1911) 575, 6 (1912) 223; Münchener med. Wochenschr. (1912) Nr. 24, Nr. 36; Berliner tierärztl. Wochenschr. (1912) Nr. 25; Beitr. z. Klinik d. Infektionskrankh. u. z. Immunitätsforsch. 1 (1913) 243; Zeitschr. f. physiol. Chem. 84 (1913) 300; Abderhalden u. Pincussohn, Ebenda 64 (1910) 100, 433, 66 (1910) 88, 71 (1911) 110; Abderhalden, Freund u. Pincussohn, Prakt. Ergebn. d. Geburtshilfe u. Gynäkol. 2, 2. Abteil. (1910) 367; Abderhalden u. Immisch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64 (1910) 423; Abderhalden u. Israel, Ebenda 64 (1910) 426; Abderhalden u. Sleeswyk, Ebenda 64 (1910) 427; Abderhalden u. Schmid, Ebenda 66 (1910) 120; Abderhalden u. Rathsmann, Ebenda 71 (1911) 367; Abderhalden u. Schilling, Ebenda 71 (1911) 385; Abderhalden u. Miki Kiutsi, Ebenda 77 (1912) 249; Weil, Berliner tierärztl. Wochenschr. (1912) Nr. 36; Hirsch, Ebenda (1914) Nr. 6; Michaelis u. v. Langermarck, Deutsche med. Wochenschr. (1914) Nr. 7.

selbe Art von Abwehrfermenten mittels demselben aus dem betreffenden Organ hergestellten Peptonpräparat ¹⁾ ein quantitativer Vergleich verschiedener Sera durch die Geschwindigkeit bis zum Erreichen einer bestimmten Drehungsänderung ermöglicht wird. Andererseits entzieht sich bei der polarimetrischen Methode die erste Eiweißspaltungsphase der Beobachtung, da natives Eiweiß Fällungen mit Serumeiweißkörpern erzeugen und dadurch die Polarisierung der Gemische verunmöglichen würde. Es kommen daher aus dem betreffenden Organ dargestellte Peptone in Anwendung, und zwar möglichst hochmolekulare, da einfachere Peptone oft durch Sera, welche die höheren Peptone abbauen, nicht mehr angegriffen werden.

Solche hochmolekulare Peptone erhält man nach Abderhalden ²⁾ aus dem betreffenden, sorgfältigst entbluteten und durch Abpressen zwischen Filtrierpapier getrockneten Organ ³⁾ durch Eintragen in die dreifache Menge kalter 70(Volum)%iger Schwefelsäure. Nach kräftigem Umschütteln wird das Gemisch verschlossen, der Hydrolyse bei Zimmertemperatur, die nicht mehr als 20° betragen darf, 3 Tage überlassen und während dieser Zeit öfters umgeschüttelt. Hierauf stellt man das Spaltgemisch in Eiswasser und verdünnt so sorgfältig mit der 10fachen Menge destilliertem Wasser, daß das Thermometer nicht über 20° steigt. Dann wird die Schwefelsäure durch Zusatz der berechneten Menge von kristallisiertem Baryt ausgefällt und nach Ausbleiben der Rotfärbung von Lackmuspapier an abfiltrierten oder abzentrifugierten Proben einerseits mit sehr verdünnter Chlorbariumlösung und andererseits mit sehr verdünnter Schwefelsäure auf das Vorhandensein eines Ueberschusses von Schwefelsäure oder Baryt geprüft, wobei berücksichtigt werden muß, daß auch Bariumsalze von Peptonen ausfallen können. Dieser Niederschlag unterscheidet sich jedoch leicht vom Bariumsulfat durch seine Löslichkeit in Salpetersäure. Nachdem die Lösung sorgfältigst in der angegebenen Weise von jedem Ueberschuß von Schwefelsäure oder Bariumhydroxyd — deren Beimengung zum Pepton dessen spätere Hydrolyse veranlassen könnte — befreit worden ist, wird dieselbe z. B. durch ein doppeltes

¹⁾ Da nicht nur der chemische, sondern auch der physikalische Zustand von Proteinen auf die Geschwindigkeit des Abbaus nach Abderhalden u. Chauncey J. Valette Pettibone, Zeitschr. f. physiol. Chem. 81 (1912) 458, von Einfluß ist, so kann nur bei völliger Gleichheit des Substrats in chemischer und physikalischer Hinsicht ein quantitativer Vergleich in Frage kommen.

²⁾ Abderhalden, Abwehrfermente, 2. Aufl., Berlin 1913, S. 174 ff.

³⁾ Bei Nervengewebe oder lipoidreichen Bazillen (Tuberkelbac., Leprabac.) muß außerdem durch Aufkochen mit Tetrachlorkohlenstoff entfettet werden.

Faltenfilter filtriert, mehrmals mit kaltem Wasser nachgewaschen und die Peptonlösung im Vakuum bei 40° eingedampft¹⁾, wobei während des ganzen Verdampfungsprozesses die Prüfung entnommener Proben auf Schwefelsäure- oder Barytreste negativ ausfallen muß. Der schließlich erhaltene syrupöse, hellgelbe Rückstand wird mit der 100fachen Methylalkoholmenge übergossen und gekocht. Die siedende Lösung wird durch ein Faltenfilter in die 5fache Menge in Eiswasser gestellten Aethylalkohol gegeben und die entstandene Fällung durch Aetherzusatz vervollständigt. Der Niederschlag wird sofort abgenutscht und mit dem Filter in einen Vakuumexsikkator verbracht. Nach 1—2 Tagen wird das trockene Pepton gewogen und mittels 9%iger Kochsalzlösung eine 10%ige Peptonlösung hergestellt. Hat man sich vergewissert, daß dieselbe mit Normalserum keine (durch einen Abbau durch beigemengte Schwefelsäure oder Baryt verursachte) Aenderung der Anfangsdrehung erleidet, so wird 1 ccm der betreffenden Organpeptonlösung zu 1 ccm des vollständig hämoglobinfreien, keinerlei Formelemente enthaltenden fraglichen Serums gefügt, das Gemisch in ein 2 ccm fassendes Polarisationsrohr verbracht und das Drehungsvermögen bei 37°²⁾ mit dem Polarisationsapparat, den die Firma Schmidt und Hänsch (Berlin) in Handel bringt und der noch Hundertstel Grade abzulesen³⁾ gestattet, bis zu 36—48 Stunden verfolgt. Jede Aenderung der Anfangsdrehung, die mehr als 0,5° beträgt, ist auf eine stattgefundene Peptonhydrolyse zurückzuführen. Bei Plazentapepton z. B. wäre dann also auf eine bestehende Gravidität zu schließen.

Ausgezeichnete Dienste vermag ferner hier das allen anderen Instrumenten an Empfindlichkeit überlegene **Löwe-Zeißsche** Flüssigkeitsinterferometer zu leisten, welches, wie schon erwähnt, die geringste Konzentrationsänderung gegenüber der Vergleichslösung durch eine Verschiebung des Interferenzbildes verrät und quantitativ zu messen gestattet. In dem vorliegenden Fall wären es die aus dem Organ-eiweiß hervorgehenden Spaltprodukte, welche die Konzentrationsvermehrung in den Proben veranlassen, die Serum + Organ enthalten,

¹⁾ Eine Abbildung des von Abderhalden verwandten Apparates findet sich in *Abwehrfermente*, loc. cit., S. 178.

²⁾ Ueber die Vorrichtung zur Beobachtung des Drehungsvermögens bei konstanter Temperatur s. *Abderhalden*, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 84 (1913) 300.

³⁾ *Abderhalden u. Wildermuth*, *Fermentforschung* 1 (1914) 63, haben die subjektiven Ablesungsfehler durch eine selbsttätige Registriervorrichtung, mittels derer die Resultate auf einer photographischen Platte fixiert werden, auszuschalten versucht. Ueber den Ersatz des Auges durch lichtempfindliche Kaliumzellen siehe *Abderhalden*, *Münchener med. Wochenschr.* (1914) 1897.

gegenüber der Vergleichslösung, welche durch das betreffende Serum für sich allein repräsentiert wird. Hirsch¹⁾, der das Interferometer in die Praxis der Abwehrfermentuntersuchung eingeführt hat, empfiehlt das folgende Vorgehen:

Ein gut verschließbares Zentrifugiergläschen wird mit dem auf Abwehrfermente zu prüfenden Serum + dem absolut trockenen, haltbaren, keine löslichen Bestandteile²⁾ enthaltenden Gewebe beschickt und ein zweites Zentrifugiergläschen mit dem Serum allein. Beide Röhrchen kommen dann 24 Stunden in den Brutschrank und werden hierauf zentrifugiert. Die klaren Sera werden dann in die Doppelkammer des Interferometers verbracht und geprüft, ob eine Verschiebung des Interferenzbildes stattgefunden hat. In diesem Fall liegt ein Abbau des betreffenden Organeiweißes vor, welcher nach den früheren Ausführungen beweist, daß das zur Untersuchung gelangte Blut schon mit jenem Eiweiß in Berührung gekommen ist und Abwehrfermente gegen dasselbe mobilisiert hat. Der außer von der Eigenart des Substrates vom Gehalt an Abwehrfermenten und von deren Aktivität abhängige Grad des Abbaus, oder mit anderen Worten der verdauende Effekt der in dem Serum enthaltenen Abwehrfermente ergibt sich aus dem Konzentrationsunterschied von Lösung und Vergleichslösung, und für diesen Konzentrationsunterschied ist das exakte Maß die Trommelteildifferenz, d. h. die Anzahl Trommelteile, welche der Drehung der Kompensatorschraube bis zur Wiedereinstellung der Nullage (in der die zusammengehörigen Streifen des oberen und unteren Interferenzbildes koinzidieren) entsprechen.

Die interferometrische Methode verlangt eine besonders sorgfältige Herstellung der verwendeten Organpräparate. Hirsch hat solche Präparate hergestellt und in der für einen Versuch notwendigen Menge in braunen Glasröhrchen

¹⁾ P. Hirsch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 91 (1914) 440; Deutsche med. Wochenschr. (1914) Nr. 31; Fermentforschung 1 (1914) 33, 2 (1918) 251; Die interferometrische Methode in Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. 8 (1915) 561; Neue Methoden zum Nachweis proteolytischer und lypolytischer Fermente mit besonderer Berücksichtigung der Abwehrfermente, Jena 1917; Abderhalden, Fermentforschung 1 (1914) 20, hat bei gleichzeitiger Anwendung verschiedener Methoden der Untersuchung auf Abwehrfermente günstige Ergebnisse mit dem interferometrischen Verfahren verzeichnet. Natürlich sind auch Einwände erhoben worden [siehe Oppler, Biochem. Zeitschr. 75 (1916) 211; Deutsche med. Wochenschr. 43 (1917) 1596; Pregl u. de Crinis, Fermentforschung 2 (1917) 58; Lindstedt, Deutsche med. Wochenschr. 44 (1918) 744]; doch dürfte der Wert der Methode hierdurch nicht betroffen sein.

²⁾ 5 ccm Kochwasser des Präparates dürfen mit 2 ccm einer 1%igen Ninhydrinlösung gekocht, keine Farbenreaktion geben.

eingeschmolzen, steril aufbewahrt. Jedes Organpulver verlangt eine besondere Behandlungsweise. Für die Darstellung eines Plazentatrockenpräparates verfährt Hirsch¹⁾ in der Weise, daß er die Plazenta auf das peinlichste mit physiologischer Kochsalzlösung entblutet, sie hierauf mit der Fleischhackmaschine zerkleinert und nach nochmaligem Auswaschen mit Tetrachlorkohlenstoff und Azeton im Extraktionsapparat entfettet. Dann kocht man den Plazentabrei und wiederholt den ganzen Prozeß ungefähr fünfmal. Hierauf wird die Plazenta in einer zum Näßmahlen geeigneten Porzellanmühle mit Motorbetrieb unter fortgesetztem Zusatz von Toluolwasser fein zermahlen und unter Toluol aufgefangen, abzentrifugiert und die Aufschwemmung des feinen Plazentabreies in möglichst wenig Wasser durch Einleiten von strömendem Wasserdampf ausgekocht, der durch einen Kulischschen Dampfentwickler erzeugt wird, der das Auskochen mehrerer Organproben erlaubt. Die Kochdauer beträgt in jedem Fall 5 Minuten und muß so oft wiederholt werden, bis 5 ccm Kochwasser mit 2 ccm der 1%igen Ninhydrinlösung nicht mehr reagieren und im Interferometer keine Verschiebung des Interferenzbildes beim Vergleich mit destilliertem Wasser hervorrufen. Eine solche Verschiebung darf auch nicht nachweisbar sein beim Vergleich von 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung, welche 24 Stunden in Berührung mit 0,5 g des Organpräparates im Brutschrank gestanden haben, mit 5 ccm der physiologischen Kochsalzlösung allein. Das allen Anforderungen entsprechende Organ wird, nach gewöhnlicher Entfernung des Wassers, mit Azeton zur vollständigen Entwässerung behandelt, auf einem gehärteten Filter rasch abgesaugt, einige Male mit Azeton nachgewaschen, dann lufttrocken gesaugt, in Jenaer Glasröhren eingeschmolzen und in diesen sofort im Kochschen Dampftopf sterilisiert. Um bei verschiedenen so hergestellten Präparaten vergleichbare Werte zu erhalten, müssen dieselben aufeinander eingestellt (standardisiert) werden, indem man die unter gleichen Bedingungen erhaltenen Trommelteile Ausschlag, die beim Abbau durch dasselbe Abwehrferment erhalten werden, feststellt. Hieraus ergibt sich der Faktor, mit dem die mit einem Plazentapräparat erhaltenen Resultate für den direkten Vergleich mit einem bestimmten anderen multipliziert werden müssen.

Die physiologische Bedeutung der parenteralen Verdauung.

Durch die Bezeichnung „Schutz- oder Abwehrfermente“ ist von Abderhalden schon eine wesentliche Funktion der im vorliegenden Abschnitt besprochenen Blutenzyme so deutlich charakterisiert worden, daß ein weiteres Kommentar überflüssig erscheint. Man muß sich jedoch fragen, ob nicht auch den auf diesem Wege gebildeten Verdauungsprodukten eine physiologische Bedeutung zukommt. ähnlich derjenigen der im Magen-Darmkanal unter dem Einfluß von Pepsin, Trypsin und Erepsin gebildeten normalen Verdauungsprodukte der aufgenommenen Nahrung.

Bei artfremdem Eiweiß, welches im Gefolge einer natürlichen, bakteriellen Infektion oder durch Einspritzen in die Blutbahn gelangt,

¹⁾ Hirsch, Fermentforschung 1 (1914) 42, 43.

werden die Spaltprodukte zwar jedenfalls zum Teil von den Körperzellen verwertet, zum Teil — wo es sich um anormale und giftige Abbauprodukte handelt — eliminiert. Aber die Verwertung solchen Materials trägt der Natur der Sache nach so sehr den Charakter des Zufälligen, daß von einer eigentlichen physiologischen Bedeutung in diesen Fällen nicht gesprochen werden kann. Etwas anderes ist es dagegen, wenn der parenterale Verdauungsprozeß selbst im Gefolge eines physiologischen Vorgangs auftritt, wie dies bei der Gravidität der Fall ist. Die entstehenden Abbauprodukte des blutfremden Materials werden auch hier teilweise mit den gewöhnlichen Abbauprodukten des Nahrungseiweißes übereinstimmen und die verschiedenen Körperzellen, welche vom Blut ernährt werden, nehmen diese Stoffe nach Maßgabe ihres qualitativen und quantitativen Bedarfes in sich auf. Ein Teil der Abbauprodukte, der mehr organspezifischen Charakter trägt, wäre dagegen überschüssig und müßte unverwertet ausgeschieden werden, wenn nicht Zellen vorhanden wären, die gerade dieser organspezifischen Abbauprodukte als Baumaterial bedürften. Daß nun in der Tat Zellen vorhanden sind, die auf die Abbauprodukte plazentaren und eventuell auch embryonalen Ursprungs als Nährmaterial gewissermaßen eingestellt sind, möchte die Verfasserin aus der Entwicklung schließen, welche die Milchdrüse gerade in demselben Zeitraum erfährt, der durch das Kreisen von Abwehrfermenten gegen Plazentaeiweiß im Blut und damit dem Abbau solchen Eiweißes gekennzeichnet ist. Die folgende knappe Zusammenstellung möge zur Erläuterung des inneren Zusammenhangs der in Frage kommenden Prozesse dienen, welche die Vorbereitung der Milchdrüse auf die Milchsekretion und die Auslösung dieser Aktion selbst nach Abschluß der Gravidität besorgen:

a) Präparatorische Phase: 1. Abgabe von Eiweißstoffen von der Plazenta und eventuell vom Embryo an das Blut. 2. Abbau des blutfremden Materials durch die Abwehrfermente des mütterlichen Blutes. 3. Resorption der Abbauprodukte durch die Milchdrüse. 4. Resynthese von Reserveeiweiß in der Milchdrüse und Deponierung im Bindegewebe. Die Synthese erfolgt nach dem Massenwirkungsgesetz. Infolge des beständigen Nachströmens von Spaltprodukten und der Deponierung des gebildeten Eiweißes in fester Form verläuft die Reaktion: genuines Eiweiß \rightleftharpoons Polypeptide \rightleftharpoons kryst. Aminosäuren ganz im Sinne einer Synthese. Die Spaltprodukte, welche die Entwicklung der Milchdrüse durch Intuszeption bedingen, wirken daher zugleich einer Spaltung des Reserveeiweißes entgegen. Da, wie im folgenden näher ausgeführt ist, die Spaltung die Ursache der Sekretion darstellt, so muß der die

Milchdrüse zur Entwicklung veranlassende Faktor, zugleich konservierend, d. h. sekretionshemmend wirken, eine Tatsache, die durch die moderne Forschung erwiesen worden ist¹⁾. Im Moment, wo dieser hemmende Faktor fortfällt, setzen die nachstehend skizzierten Veränderungen ein, wiederum auf der Basis des Massenwirkungsgesetzes:

b) Phase der Veränderungen, welche die Loslösung (bzw. Ausstoßung) der Plazenta im Gefolge hat: 1. Das Blut verarmt mehr und mehr an den Eiweißstoffen placentaren Ursprungs und damit an den im Blut unter dem Einfluß der Abwehrfermente gebildeten Abbauprodukten. 2. In der Milchdrüse, von der nun keine Abbauprodukte aus dem Blut mehr resorbiert werden können, setzt nach dem Massenwirkungsgesetz die Spaltungsphase des deponierten Eiweißes ein und zwar am frühesten in den innersten, zuerst an Spaltprodukten verarmenden Partien der noch soliden Alveolen. 3. Durch die Hypertonie, die sich auf Grund der Bildung von Spaltprodukten entwickelt, werden die Zellmembranen erst gedehnt, dann platzen sie, und an Stelle der ursprünglich soliden Alveolen finden sich hohle, nur mit den Zerfallsprodukten der zerstörten Zellen erfüllte Bläschen. Die Zerfallsprodukte, speziell die aus dem Kernzerfall herrührenden Nukleinsäuren, wirken sehr stark spezifisch chemotaktisch auf die Leukozyten. Es kommt daher zu einer massenhaften Einwanderung derselben in die Milchdrüse, wie dies für das Kolostrastadium charakteristisch ist. 4. Ist nur noch eine einschichtige Epithelzellenlage vorhanden, so zerfällt auch in diesen Zellen das deponierte Eiweiß, die Spaltprodukte dehnen die Membran am freien, lumenwärts zu gerichteten Ende. 5. Folge jenes Zustandes der Hyperosmose ist:

1. ein osmotischer Zustrom von Flüssigkeit

a) aus dem Lumen der Alveolen,

b) aus dem Blut der angrenzenden Gefäße.

ad a: Die Flüssigkeitsabgabe aus dem Lumen der Alveolen und die dadurch bedingte Vermehrung der Konzentration der im Lumen befindlichen Lösung bringt eine Resynthese des löslichen Trümmers der betroffenen Milchdrüsenzellen und der zugrundegegangenen Leukozyten nach dem Massenwirkungsgesetz mit sich, wobei die Endoenzyme der zerstörten Zellen (autolytische Fermente) als beschleunigendes Agens fungieren. Infolge von Umlagerungen, die die primären Spaltprodukte erleiden, entstehen bei der Resynthese Eiweißkörper, wie insbesondere das Kasein und Polysacharide, wie vor allem der Milchzucker, die der Milch gegenüber dem Blut mit seinen entsprechen-

¹⁾ Hildebrand, siehe in Sommerfelds Handb., Die Milch.

den Eiweißkörpern und Polysachariden ihr besonderes Gepräge verleihen.

ad b: Der Flüssigkeitszustrom aus dem Blut dokumentiert sich in dem Einschießen der Milch in die Milchdrüse.

2. Die fortgesetzte Membrandehnung. Sie führt zum Platzen der Membran und zum ganzen oder teilweisen Ergießen des Zellinhaltes in das Lumen, das nunmehr ein Maximum aufweist. Der Lumeninhalt besteht folglich aus dem Material der Zellen selbst, also vornehmlich aus einem Gemisch von Zelleiweiß und Depoteiweiß in verschiedenen Phasen des autolytischen Abbaus und den Zellfermenten aus dem Material der eingewanderten, fettbeladenen Leukozyten, sowie aus dem osmotisch eingewanderten Wasser und mit dem Wasser mitgerissenen Blutbestandteilen. Die Fettbeladung der Leukozyten kann daher rühren, daß die in regressiven Veränderungen begriffene uterine Muskulatur, wie andere in Rückbildung begriffene Organe, in den nicht zur Erhaltung bestimmten Teilen degeneriert. Den Leukozyten fällt dann die Aufgabe zu, die degenerierten Zellen in sich aufzunehmen und sie aus dem betroffenen Gewebe zu entfernen, ein Vorgang der seine Analoga in den Veränderungen der Muskulatur des in Rückbildung begriffenen Froschlarvenschwanzes besitzt¹⁾, sowie in der Muskelumarbeitung, die bei der Insektenmetamorphose²⁾ stattfindet. Bei den letzteren, besonders genau studierten Vorgängen ist das charakteristische, daß die von den Leukozyten aufgenommenen Muskeltrümmer der fettigen Degeneration verfallen und schließlich als eigentliche Fetttropfen in den Phagozyten erscheinen. Es ist dies eine Folge der intrazellulären Verdauung des von den Leukozyten aufgenommenen überflüssigen Gewebematerials. Das Gewebefett, welches offenbar nicht angegriffen wird, wird mit der Lösung des Eiweißes sichtbar. Das Gemisch von unverdaulichem Fett und mehr oder weniger weitgehend verdaulichem Eiweiß wird nun von den Leukozyten an die in Entwicklung begriffenen Gewebe transportiert und bei deren Aufbau zweckentsprechend verwendet. Es muß durchaus plausibel erscheinen, daß die wohl schon zum Teil vor ihrer Aufnahme durch die Leukozyten durch Fettinfiltration aus den Fettdepots des Organismus

¹⁾ Sigm. Mayer, *Anat. Anzeiger* 1 (1886); siehe ferner Derselbe, *Zeitschr. f. Heilkunde Prag* 13 (1887); Loos, Ueber die Beteiligung der Leukozyten an dem Zerfall der Gewebe im Froschlarvenschwanz, Leipzig (1889).

²⁾ Weißmann, *Zeitschr. f. wissensch. Zoologie* 14 (1864); Metschnikoff, *Ebenda* 16 (1866); Kowalewsky, *Ebenda* 45 (1887); van Rees, *Zool. Jahrb. von Spengel, Abt. f. Anat. und Ontolog.* 3 (1888); Korotneff, *Biol. Zentralbl.* 12 (1892); de Bruyne, *Arch. de Biol.* 14 (1896).

mus fettig degenerierten Teile der in regressiven Veränderungen befindlichen Muskulatur des Uterus genau dasselbe Schicksal erleiden. Während auch hier die intrazelluläre Verdauung die Eiweißsubstanzen der phagozytierten Muskeltrümmer betrifft, bleibt in Ermangelung eines lipolytischen Endoenzyms die intrazelluläre Fettverdauung aus. Das Fett kann dementsprechend in freier Form als die Leukozyten erfüllende Tröpfchen erscheinen und wird in dieser Form von den Phagozyten in die Milchdrüsenzellen transportiert, in denen es nach dem Zugrundegehen der Leukozyten im basalen Teil des Protoplasmas zu finden ist.

Selbstverständlich werden nicht nur die mit den Muskeltrümmern beladenen Leukozyten von den Nukleinsäuren der zerfallenden Zellkerne in die Milchdrüsenzellen chemotaktisch angelockt, sondern auch andere Leukozyten. Unter anderem kommen mit der Mobilisierung von Depotfett und dem Transport des Fettes der aufgenommenen Nahrung beschäftigte Leukozyten hinzu, so daß das MilCHFett eine gemischte Herkunft besitzt. Es würde danach von der uterinen Muskulatur — nach dem zu dem betreffenden Zeitpunkt herrschenden Grad ihrer regressiven Veränderungen — vom deponierten Körperfett und vom Fett der Nahrung abstammen. Die Unterschiede, die das Kolostralfett gegenüber dem gewöhnlichen MilCHFett zeigt, dürften mit dem Ueberwiegen der ersten Komponente zu Beginn der postpuerperalen Involution des Uterus zusammenhängen, in welchem Stadium vielleicht zu den gewöhnlichen Leukozyten noch Phagozyten muskulären Ursprungs, die aus den degenerierenden Muskeln selbst hervorgehen und die als Myoklasten oder Sarkoklasten bezeichnet werden¹⁾, hinzukommen. Wie die gewöhnlichen Leukozyten, nehmen auch die Myoklasten Muskeltrümmer auf (Autophagozytose) und wandeln sich im Gefolge der intrazellulären Verdauung derselben in Fettzellen um. Die dem Kolostrum eigentümlichen amöboiden Phagozytenformen — die Kolostrumkörperchen — würden zugunsten einer solchen Auffassung sprechen. Während das Fett gewissermaßen den unverdauten Rest der phagozytierten Muskeln darstellt, dürfte das Myosin der Muskeln in lösliche Substanzen übergeführt werden, die vielleicht als Baumaterial des Kaseins neben den Abbauprodukten des Fibrinogens, das dem Blutplasma entstammt, betrachtet werden könnten. Albumin und Globulin der Milch würden demgegenüber von den entsprechenden Eiweißkörpern des Blutserums derivieren.

¹⁾ Vgl. Metschnikoff, Biol. Zentralbl. 3 (1883); Arb. aus d. Zool. Inst. zu Wien 5 (1883), loc. cit. vorige Fußnote; Sigm. Mayer, loc. cit. vorletzte Fußnote; de Bruyne, loc. cit. vorige Fußnote und Arch. de Biol. 15 (1898).

Es würde zu weit führen, die Vorgänge in der Milchdrüse vor und während der Milchsekretion hier im einzelnen zu verfolgen. Kurz zusammengefaßt wären sie also während der Gravidität — im Sinne meiner hier skizzierten Auffassung — im wesentlichen charakterisiert durch die Synthese und Deponierung von Reservestoffen, insbesondere Eiweiß, aus den Produkten der parenteralen Verdauung von Material, das von der Plazenta und eventuell dem Embryo, an das mütterliche Blut abgegeben wird. Die der Milchdrüse zuströmenden parenteralen Verdauungsprodukte wirken eo ipso, nach dem Massenwirkungsgesetz, als abbauhemmendes und damit zugleich als sekretionshemmendes Agens. Mit dem Verschwinden dieser Stoffe aus dem Blut, nach Loslösung der Plazenta, geht die synthetische Phase des reversibeln Vorgangs in die abbauende über. Die in den Zellen sich anhäufenden Spaltprodukte bedingen Hypertonie, Dehnung und Zerreißen der Membranen (Alveolenbildung), osmotischen Wiederausgleich durch Einströmen von Flüssigkeit, Anlocken von Leukozyten als Folge des Zell- bzw. Kernzerfalls, Ersatzzellenbildung durch Mitosen usw. Daß die abbauende Phase, einmal ausgelöst, anhält, wird durch die Eliminierung des Abbaumaterials durch den Saugakt garantiert. Mit dem Sistieren des letzteren sind erst wieder die Bedingungen für die resynthetische Phase realisiert. Am Ende der Laktationszeit werden zur Synthese von Zellmaterial ungeeignete Trümmer, wie auch überflüssig gewordene Organteile, in derselben Weise unter Zuhilfenahme der Leukozyten eliminiert, wie dies bei den regressiven Veränderungen der uterinen Muskulatur beschrieben worden ist. Daher wird das Ende der Milchsekretion wie ihr Anfang durch ein kolostrales Stadium charakterisiert.

Vom Wesen der Sekretion.

Die im vorigen Abschnitt erwähnten Vorgänge vor und während der Milchsekretion stellen keinen Einzelfall unter den Sekretionsprozessen dar. Die Unterschiede der Verdauungssekrete gegenüber einem Sekret wie der Milch sind nicht prinzipieller Natur, sondern liegen vielmehr darin, daß wir nach der quantitativen Zusammensetzung und — damit zusammenhängend — den Funktionen, denen sie angepaßt sind, die Gewohnheit haben, diese Sekrete von einem gänzlich anderen Gesichtspunkt aus zu bewerten. Während bei den Verdauungssekreten naturgemäß ihr Fermentgehalt im Vordergrund des Interesses steht und der Gehalt an Eiweiß und seinen Abbauprodukten, sowie anderem Zelltrümmermaterial nebensächlich erscheint, liegt bei der Milch die

Sache gerade umgekehrt. Trotz ihres Reichtums an Fermenten werden dieselben wenig berücksichtigt, während der Gehalt an Eiweißstoffen, Fett und Milchzucker für die praktische Nutzenanwendung das wesentlichste ist. Nichtsdestoweniger dürfte hier wie dort das Massenwirkungsgesetz sowohl die synthetischen Vorgänge, die die Sekretion vorbereiten, wie die abbauenden Prozesse, die als die unmittelbare Ursache der Sekretion zu betrachten sind, dominieren. Die Verdauungs- und Resorptionsvorgänge der Wirbellosen bieten hierfür — in allen Klassen, in denen die morphologische und physiologische Forschung vorgeschritten genug ist, um als Basis zu dienen — eine Fülle frappanter Beispiele.

Was zunächst die Krustazeen betrifft, bei denen der Mitteldarm selbst oder der zur Mitteldarmdrüse, den sog. Leberschläuchen, umgebildete Mitteldarm das Verdauungssekret liefert, so findet die fermentative Doppelfunktion ihren Ausdruck in den morphologischen Befunden, welche manche Forscher zu der Annahme zweier verschiedener Zellarten im Epithel der Drüsenschläuche geführt haben. So gibt M. Weber¹⁾ an, daß die Zellen der einen Art „einen fettartigen Körper bilden, an welchen der tierische Farbstoff gebunden ist“. Die Zellen der anderen Art sind durch ein wasserhelles Sekretbläschen ausgezeichnet. Im Sinne der hier vertretenen Auffassung wären nun in den Zellen der einen Art Orte der Fettsynthese, in denjenigen der anderen Art dagegen Orte der Fettspaltung zu erblicken. Es würde sich nicht um prinzipiell verschiedene Zellarten mit prinzipiell verschiedenen Funktionen handeln, sondern vielmehr um die verschiedenen Phasen eines und desselben Prozesses, wie er durch die im Allg. Teil²⁾ und im folgenden (S. 404) angegebene reversible Gleichung der Fettspaltung bzw. der Fettsynthese wiedergegeben ist. Danach wäre zu erwarten, daß sich in den Zellen der Mitteldarmdrüse, resp. der Mitteldarmdivertikel, nicht nur 2 Zellarten von extremem Bau und Funktion finden müßten, sondern alle denkbaren Uebergänge zwischen den beiden Extremen, wobei die Uebergangsformen bald den Typus der „synthetischen Zelle“, bald den Typus der „Spaltungszelle“ vorwiegend aufweisen würden. Daß die Tatsachen mit der Annahme solcher Uebergänge übereinstimmen, zeigen die Beobachtungen von Frenzel³⁾, der bei Isopoden zahlreiche Uebergänge zwischen den von Weber

¹⁾ M. Weber, Archiv f. mikroskop. Anat. 17 (1880) 388; siehe ferner Manile Ide. La cellule 8 (1892) 160.

²⁾ Siehe das letzte Kapitel des Allg. Teils: „Katalyse und Reversibilität“.

³⁾ Frenzel, Mitteil. der zool. Station in Neapel 5 (1884) 50.

beschriebenen Zellarten festgestellt hat. Er hatte daher angenommen, daß es sich um ungleich alte Zellen derselben Art handle¹⁾. Bei den Gamariden hat Weber 6—8 miteinander alternierende Streifen festgestellt, die zwei verschiedenen Zellarten zu entsprechen scheinen. Da Weber annimmt, daß die eine dieser Zellarten, bei der zahlreiche Sekrettröpfchen beobachtet werden, einer sekretorischen, die andere einer reservestoffspeichernden Funktion entspricht, so unterscheidet er die verschiedenen Streifen als „Sekretionszellenbänder“ und als „Reservezellenbänder“. Die ersten würden nun der fettabbauenden, die letzteren der fettaufbauenden Phase entsprechen und es würde sich empfehlen ganz allgemein diejenigen Zellen als Sekretzellen zu bezeichnen, in denen ein Abbau stattfindet. Denn eine im gewöhnlichen Sinne sekretorische Wirkung kommt nur den Zellen in der abbauenden Phase zu und zwischen dem endoenzymatischen Abbau und der Bildung eines eigentlichen, in den Verdauungsschlauch abgesonderten Sekretes dürfte ein ursächlicher Zusammenhang bestehen. Um diesen inneren Zusammenhang zu erfassen, muß man sich die Vorgänge im einzelnen vergegenwärtigen, welche in einer Zelle sukzessive vor sich gehen müssen, in der ein Abbau eingesetzt hat:

Gehen wir den sekretbildenden Vorgängen auf Grund der für die Krustazeen vielleicht wichtigsten endoenzymatischen Fettspaltung nach, so muß sich das Einsetzen der endoenzymatischen Spaltung zunächst darin äußern, daß sich um die einzelnen, von seiten der Lipasen der Zellen angegriffenen Fettgranula Höfe bilden, die mit den Spaltprodukten des betreffenden Fettes erfüllt sind. Dies hat zur Folge, daß z. B. bei Isopoden die kleinen, noch unveränderte Granula enthaltenden Zellen eine rasche Granulaschwärzung mit Osmiumsäure ergeben, während die großen Zellen, in denen die Fettspaltung einem vorgereckteren Stadium entspricht, erst nach längerer Zeit eine Schwärzung ihrer Granula zeigen, wobei — wenn überhaupt eine Schwärzung eintritt — vornehmlich der innerste Kern als Beweis für seine Fettnatur von der Schwärzung betroffen wird. Das Haupthindernis, welches die Osmiumsäure zu überwinden hat, bis sie zu dieser zentralen Partie gelangt — ein Hindernis, welches eine hinreichende Erklärung für die Zeitdifferenz in der Schwärzung der noch unangegriffenen und der angegriffenen Fetttropfen darstellt —, bildet das Grenzhäutchen, welches jeden im Protoplasma schwimmenden Fetttropfen umgibt. Solange das Grenzhäutchen dem Granulum unmittel-

¹⁾ Siehe desgleichen die Ansichten von Claus, Zeitschr. f. wissensch. Zool. 25 (1874); Lehrb. d. Zool. 4. Aufl. (1887); Rosenst. d. Biol. Zentralbl. 8 (1888) u. a.

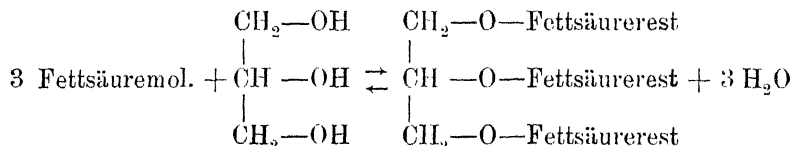
bar anliegt, stellt es noch kein in Betracht fallendes Hindernis dar, so daß die Schwärzung rasch erfolgen kann. Anders dagegen, wenn sich schon Spaltprodukte rings um den Fetttropfen bilden konnten. Da wenigstens die Fettsäuren nicht durch das Grenzhäutchen hindurchzuwandern vermögen, bedingen sie seine osmotische Dehnung. Hierdurch wird es in dem Maß vom Fetttropfchen entfernt, als die Konzentration der Spaltprodukte zunimmt. Damit wird das fettartige Granulum aus der direkten Wirkungssphäre der Osmiumsäure herausgerückt und wird derselben erst zugänglich, nachdem wie bei der Dialysiermethode von van Calcar die Durchlässigkeitsverhältnisse des Grenzhäutchens durch die osmotische Spannung bessere geworden sind. Mit der zunehmenden Spannung treten dann auch allmählich durch Membrandiffusion oder gewaltsam durch Zerreißen des Grenzhäutchens die eingeschlossenen Spaltprodukte und die nach Auflösung der Granula frei gewordenen Fermente aus und es vollzieht sich nun in der ganzen Zelle der Vorgang der Membrandehnung durch die membranimpermeablen Spaltprodukte. Hierdurch würden die Beobachtungen einer abnormen Zellvergrößerung ihre Erklärung finden. Schließlich werden die Zellmembranen, wie die Grenzhäutchen der Bläschen durch den wachsenden osmotischen Druck im Zellinnern so weit gedehnt, daß sie für Bestandteile des Zellinhaltes in steigendem Maße durchlässig werden oder zerreißen. Im letzteren Fall treten dann außer den frei im Zellinhalt befindlichen Fermenten und den Spaltprodukten — sowie dem in beginnender Autolyse befindlichen Zelleiweiß selbst — auch die zur Zeit des Platzens der Zellmembran noch nicht zerrissenen, um die Granula gebildeten Blasen frei in das Lumen des Darms bzw. in das Lumen der Divertikel oder Leberschläuche aus, wie dies in zahlreichen Fällen in allen Tierklassen und speziell bei den Krustazeen, bei den verschiedensten Formen beobachtet werden kann. Bei vielen Dekapoden füllt die „reife“ membranöse Sekretblase, in der sich häufig Tyrosinkristalle (als Zeichen des Eiweißabbaus) finden, fast die ganze Zelle aus.

Die Blasenbildung ist, wie erwähnt, an des Vorhandensein eines Grenzhäutchens geknüpft. Handelt es sich nicht um Tröpfchen einer vom Protoplasma verschiedenen Flüssigkeit, sondern um kristallisierte oder amorphe Reservestoffe z. B., so steht bei deren Spaltung im Zellinnern der freien Diffusion der Spaltprodukte keine andere trennende Membran entgegen als die Zellwand selbst, die daher osmotisch in der Richtung, in der sie keinem Gegendruck begegnet, also gegen das Darmlumen zu, vorgewölbt wird und schließlich platzt, wobei der

Zellinhalt mit den eingeschlossenen Fermenten frei wird, die nun im Darmlumen ihre Wirkung fortzusetzen vermögen.

Wie aber auch das durch eine endoenzymatische Spaltung gebildete und durch osmotischen Ueberdruck, welchen die entstehenden Spaltprodukte verursachen, aus den Zellen frei werdende Sekret im einzelnen in das Darmlumen oder die Drüenschläuche gelangt, immer würde es seinen verdauenden Effekt den auf die angegebene Weise frei gewordenen Endoenzymen der Darmepithelzellen bzw. der Zellen der Divertikel oder Drüenschläuche verdanken.

Die unter dem Einfluß der Verdauungsenzyme aus dem Nahrungsstoff gebildeten Spaltprodukte werden nun von dem beständig sich erneuernden Darmepithel resorbiert und in dem Maß, als die Resorption zu einer Anhäufung der Verdauungsprodukte in den Darmepithelzellen führt, werden deren Endoenzyme gezwungen, die Synthese zu beschleunigen, die nach dem Massenwirkungsgesetz vor sich gehen muß, wenn in der reversibeln Reaktion:



die Produkte auf der linken Seite, also die Spaltprodukte Glycerin und Fettsäure, das Feld behaupten. Mit der intrazellulären Synthese und Deponierung von Reservematerial ist nun wiederum die Voraussetzung für den intrazellulären Abbau und damit für die Sekretion geschaffen.

Dieselbe Beziehung zwischen aufbauender und abbauender, im letzteren Fall also zur Sekretbildung führender Reaktion würde auch bestehen, wenn es nicht, wie hier vermutet wurde, in den Darmepithelzellen deponiertes Fett, sondern Reserveeiweiß oder Kohlenhydrat wäre. Jedenfalls muß es sich aber bei den erwähnten Einschlüssen um Reservematerial handeln, da sie beim Hungern allmählich abnehmen und nach längerem Hungern völlig aus den Zellen verschwunden sind.

Dasselbe gilt auch für das gleichzeitige Vorhandensein von zweierlei im Hunger verschwindenden Zelleinschlüssen, wie sie Bellonci¹⁾ und Frenzel²⁾ bei Sphaeroma und letzterer auch bei einigen anderen marinen Isopoden beobachtet haben. Neben den

¹⁾ Bellonci, Rendi Accad. Sc. Bologna (1881).

²⁾ Frenzel, Mitteil. d. zool. Station in Neapel 5 (1884) 50; Archiv f. mikroskop. Anat. 25 (1885) 137.

grünlich oder bräunlich gefärbten Fettkugeln finden sich dort in den Zellen der Leberschläuche gleich gefärbte Kristalle, deren Menge und Größe in der auffallendsten Weise mit dem Ernährungszustand der Tiere variiert. Für diese Kristalle soll die Eiweißnatur sichergestellt sein.

Daß im Hunger die Fettgranula und andere, als Reservematerial dienende, Zelleinschlüsse verschwinden, ist wiederum eine selbstverständliche Folge des Massenwirkungsgesetzes. Denn gelangt keine Nahrung in den Darm, die daselbst verdaut werden könnte, so kommen auch keine Spaltprodukte zur Resorption und das vorhandene Reservematerial wird daher ungehindert gespalten unter dem beschleunigenden Einfluß der Endoenzyme der von den Granula erfüllten Zellen. Hierdurch wird der Hunger in der vorhin angegebenen Weise zum sekretionsauslösenden Moment und nach erfolgter Nahrungsaufnahme finden Eiweiß, Fett und Kohlenhydrate im Darmkanal schon die für ihre Verdauung erforderlichen Enzyme vor. Durch das Einsetzen der Resorption von seiten der Darmwandungen, bzw. des Epithels der Leberschläuche, werden die gebildeten Spaltprodukte beständig aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt, so daß die Spaltung quantitativ zu Ende gehen kann. Zugleich liefern die Spaltprodukte nach ihrer Resorption unter dem synthesebeschleunigenden Einfluß der Endoenzyme aufs neue die Granula und verwandte Einschlüsse, deren Abbau aber erst wieder in irgend einer Zelle in dem Moment einsetzt, wenn die Konzentration der Spaltprodukte, die nach der früheren Nahrungsaufnahme gebildet und resorbiert worden sind, soweit herabgesetzt ist, daß die Voraussetzungen für den Ablauf der Reaktion, im Sinne einer Spaltung, für jene Zelle gegeben sind. Damit setzt aber wieder die Sekretbildung ein, welche die Verdauung des nächsten Nahrungsschubes ermöglicht, und die nun gebildeten Verdauungsprodukte liefern nach ihrer Resorption wieder das Material für die Granula usw. So haben wir einen normalerweise ununterbrochen arbeitenden, alternierenden Mechanismus vor uns, dessen beide entgegengerichtete, durch das Massenwirkungsgesetz beherrschte Phasen einander wechselseitig auszulösen vermögen.

Wohl überall in der Natur ist der Hunger die Voraussetzung für die nachfolgende Tätigkeitsphase bei der Verdauung. Das Tempo, in dem der Wechsel der Hunger- und Tätigkeitsphase erfolgt, dürfte aber nicht nur von Tierklasse zu Tierklasse, sondern auch von Spezies zu Spezies stark variieren und damit verschiebt sich das morphologische Bild, das die Zellen in irgend einem Zeitpunkt bieten, ganz bedeutend.

Bei den Krustazeen scheint der Hunger, d. h. das Fehlen resorbierbarer Spaltprodukte, unmittelbar den Abbau der Granula, die Sekretbildung und die Ausscheidung des Sekretes in den Darm nach sich zu ziehen, so daß der folgende Nahrungsschub schon das fertige Sekret vorfindet. Dies bedeutet in denjenigen Fällen einen schweren Nachteil, in denen die Nahrung längere Zeit ausbleibt, denn wie Frenzel bei Dekapoden zeigen konnte, findet dann — trotzdem nichts zu verdauen ist — eine weitere Abgabe von Sekretblasen in den Darm statt, den diese dann oft unverändert passieren. Hierdurch verarmen aber die Zellen mehr und mehr an Granula. Es erfährt somit die Sekretbildung und damit die verdauende Kraft in dem Maß eine Abschwächung, je länger der Hunger währt, und mit dem völligen Aufbrauch der Granula hört auch die Fähigkeit der Regeneration der verdauenden Funktionen nach erfolgter Fütterung auf, vorausgesetzt, daß nicht dem Tier, statt normaler Nahrung, schon z. B. durch bakterielle Zersetzung vorverdaute dargeboten wird.

Demgegenüber finden wir bei höheren Organisationsformen meist eine Ausstoßung des Sekretes erst dann, wenn Bedarf für dasselbe vorhanden ist, also unter dem Reiz der eingeführten Nahrung. In diesen Fällen, bei denen ein unnützer Verbrauch des fermentativen Rüstzeuges vermieden ist, dürfte zwar auch schon im Hungerstadium ein Abbau der Granula einsetzen, aber die gebildeten Sekretbläschen bleiben der Zelle so lange erhalten, bis ein äußerer Anstoß, wie er normalerweise durch die eingeführte Nahrung erfolgt, denselben zum Durchbruch verhilft.

Das über die Sekretbildung bei den Krustazeen Beobachtete findet sich auch bei anderen Tierklassen in ähnlicher Weise wieder. Da und dort konnte schon im vorigen auf Analogieen bei anderen Sekreten und anderen Tierklassen hingewiesen werden, auf das gleiche Prinzip, das diesen Erscheinungskomplex in der ganzen Natur beherrscht. Es gilt dies für den Zusammenhang zwischen Hunger und sekretiver Tätigkeit, für die Bedeutung der Resorption als sekretbildendes Moment; es gilt dies für die Rolle der Osmose bei den intrazellulären Verdauungsprozessen, die zur Umwandlung der Endoenzyme in Verdauungsssekrete führen; es gilt dies endlich für das Massenwirkungsgesetz als regulierender Mechanismus der endoenzymatischen und der exoenzymatischen Vorgänge. Daher finden wir auch überall das der aufbauenden und abbauenden Phase der endoenzymatischen Prozesse entsprechende Bild, wie wir es für die Krustazeen, nach den Beschreibungen der Morphologen, wiedergegeben haben.

Zunächst tritt uns dieses Bild entgegen in den Epithelzellen der Mitteldarmdivertikel von Arachniden. So fand Berlese¹⁾ an Schnitten der Mitteldarmdrüse von Skorpionen und Spinnen Zellen, die nach Größe und Färbbarkeit zwei ganz verschiedenen Typen entsprechen. Die Zellen der einen Art sind klein: mit Karmin färben sie sich sehr stark. Der unverhältnismäßig große Kern dieser Elemente deutet auf eine Beziehung desselben zu den funktionellen Leistungen der Zelle hin, und in der Tat hat Berlese angenommen, daß die Fermente aus dem Zellkern austreten. In der Folge sollen sie sich zwischen den kugeligen Zelleinschlüssen verteilen, zu deren Bildung sie ein wesentliches Moment darstellen. Die Einschlüsse bestehen nämlich, wie dies durch die charakteristischen Reaktionen z. B. bei *Tegenaria* einwandfrei festgestellt werden kann, aus Eiweiß und zwar würden sich die Eiweißkugeln nach Berlese (l. c.) aus resorbiertem Nahrungsprotein, resp. dessen in das Zellinnere gelangenden Spaltprodukten bilden. Was die Zellen der anderen Art betrifft, so sind sie von auffallender Größe, aber kleinkernig. Ihre Färbbarkeit mit Karmin ist nur sehr gering. Auch diese Zellen sind erfüllt mit einer größeren oder geringeren Zahl von Eiweißkugeln von zum Teil beträchtlicher Größe (Abb. 1, Tafel I). Vor allem sind sie aber von den Eiweißkugeln der erstgenannten Zellen durch ihr Verhalten bei der Heidenhainschen Hämatoxylinfärbung unterschieden. Während die kleinen Zellen die Eiweißeinschlüsse als helle, runde, feiner oder gröber punktierte Flecke in einer schwarzen Zwischensubstanz hervortreten lassen (wobei gegen das freie Ende der Zellen zu die Einschlüsse mit größeren Punkten überwiegen und keine schwarze Zwischensubstanz vorhanden ist), erscheinen die Eiweißkugeln der großen Zellen in ihrer ganzen Masse tief schwarz gefärbt, umgeben von ungefärbtem Plasma. Es beruht dieser Unterschied nach Berlese darauf, daß es sich bei den kugeligen Einschlüssen der großen Zellen um Eiweiß handelt, das der Peptonisation unter dem Einfluß der Zellfermente verfallen ist. Bei den kleinen Zellen dagegen sind die mit Hämatoxylin unter Schwarzfärbung reagierenden, resorbierten Eiweißspaltprodukte in ungeformtem Zustand im Plasma vorhanden. Wo sich aus denselben schon kugelige Einschlüsse unter dem Einfluß der synthetisierenden Wirkung der Endoproteasen gebildet haben, liegt genuines Eiweiß vor, das mit Hämatoxylin nicht reagiert. Nur Spuren noch unveränderter Peptone lassen sich im Innern durch die schwarze Punktierung bei der Hämatoxylinfärbung erkennen. Die chemischen

¹⁾ Berlese, *Rivista di Patol. vegetale* 5 (1896) 129; 7 (1899) 1.

Differenzen, die der ungleichen Färbung der Eiweißkugeln in den beiden Zelltypen der Leberepithelzellen zugrunde liegen, entsprechen also auch bei den Arachniden deutlich den beiden Phasen eines reversibeln Prozesses: einer Eiweißsynthese aus den resorbierten, im Verdauungskanal exoenzymatisch gebildeten Spaltprodukten und einer Spaltung, einer „Peptonisation“ (Berlese) jenes resorbierten, in den Zellen deponierten Eiweißes.

Die hier entwickelte Auffassung einer Doppelfunktion entspricht durchaus dem Bild, das Berlese von den Vorgängen in den Epithelzellen der Mitteldarmdrüse von Spinnen, Milben und Skorpionen entworfen hat. So sagt er: „Le cellule epiteliali della grossa glandola o tasca epatica assorbono sostanze albuminoide e le coagulano nel loro interno dove rimangono più o meno lungamente in deposito. 2. trasformano nel loro interno le dette sostanze in peptoni.“ Allerdings hat Berlese nur die peptonisierende, nicht aber die eiweißdeponierende Phase mit den intrazellulären Fermenten in Beziehung gebracht. Daß er aber die beiden Prozesse als innerlich zusammengehörig betrachtet, geht schon daraus hervor, daß er die großen Zellen lediglich als ein vorgerückteres Entwicklungsstadium der kleinen Zellen betrachtet. Berleses Auffassung ist also derjenigen verwandt, welche Frenzel, wie gesagt, z. B. bei den Land- und Wasserasseln der Annahme von Weber, daß zwei verschiedene Zellarten vorliegen, gegenübergestellt hat. Wie Frenzel seine Auffassung stützen konnte durch den Nachweis von Uebergangsformen zwischen den beiden Zelltypen, so muß man auch im vorliegenden Falle suchen, ob Uebergänge irgendwelcher Art bestehen.

Soweit es sich um die Eiweißkugeln handelt, steht dies außer allem Zweifel. Bei den kleinen Zellen finden wir in den Eiweißkugeln bei der Hämatoxylinfärbung häufig gröber punktierte Elemente und selbst Kugeln mit größeren, schwarz gefärbten Partikeln, wenn man sich möglichst vom Basalteil der Zellen entfernt (Abb. 1, Tafel I).

Umgekehrt weisen die großen Zellen in ihrem basalen Teil Eiweißkugeln im Zustand unvollkommener Schwärzung auf. Manche dieser Einschlüsse enthalten größere schwarze Inhaltsbestandteile; andere zeigen nur dieselbe gröbere oder feinere Punktierung, wie sie auch den Eiweißkugeln der kleinen Zellen eigentümlich ist. An ihrem freien Ende dagegen sind die großen Zellen ausschließlich mit den schwarzen „peptonisierten“ kugeligen Einschlüssen erfüllt. Dieses Bild erklärt sich physiko-chemisch im Zusammenhang mit der osmotischen Dehnung, welche die entstehenden Eiweißspaltprodukte am

Tafel I.

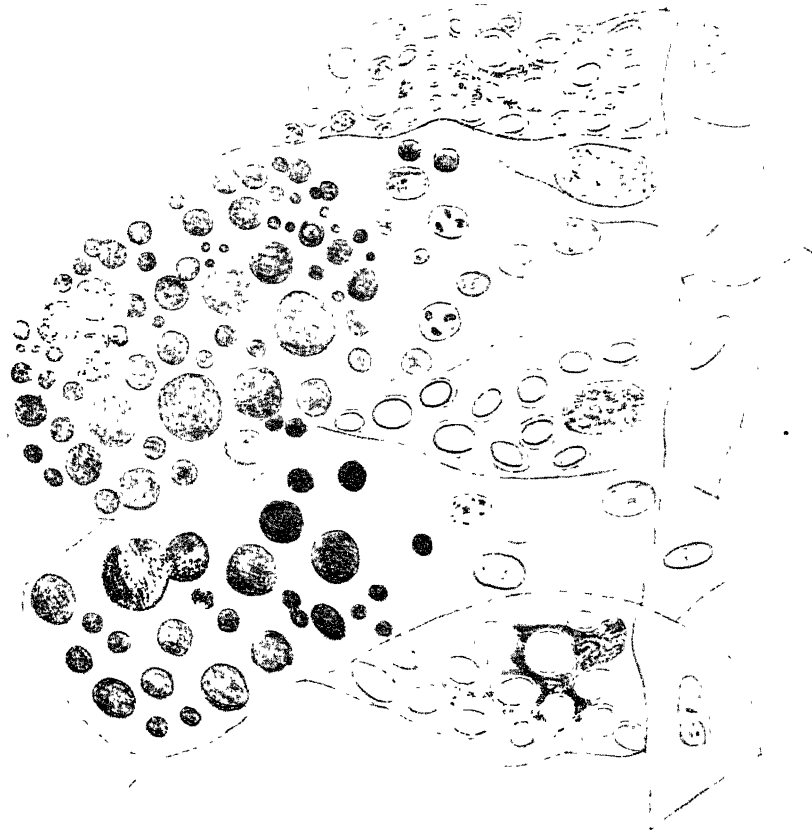


Abb. 1. „Leber“epithel von *Tegenaria domestica* (Hämatoxylinfärbung) mit Eiweißkugeln in verschiedenen Stadien. (Nach Berlese.)

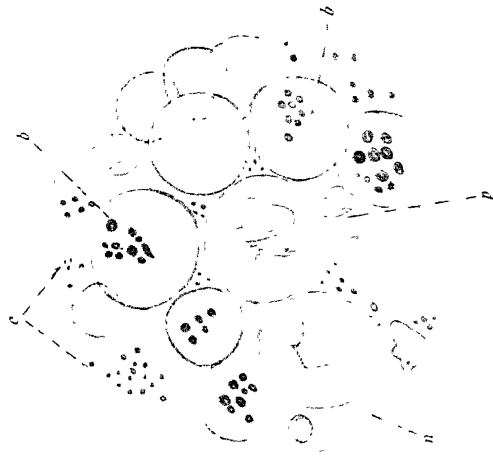


Abb. 2. Freie Epithelzelle aus einem Darmdivertikel von *Trembidium fuliginosum* mit folgenden Inhaltsbestandteilen:

- n = Kern
 - b = Eiweißkugeln mit einge-chlossenen Fermenttröpfchen
 - c = freie Fermentgranula
 - p = Pilzspore
- (Nach Berlese.)

freien Ende hervorzurufen vermögen. Hierdurch vermindern die Spaltprodukte ihre Konzentration, denn ihre in irgend einem Moment vorhandene Menge verteilt sich nach der Volumenvergrößerung im freien Zellabschnitt auf einen größeren Raum. Die Konzentrationsverminderung auf Seite der Spaltprodukte bedeutet aber eine Gleichgewichtsverschiebung, die automatisch die Herstellung der ursprünglichen, dem Gleichgewicht zwischen abbauender und aufbauender Reaktion, z. B. genuines Eiweiß \rightleftharpoons n-Peptide (Polypeptide) entsprechenden Konzentration an Spaltprodukten nach sich zieht. Die Nachlieferung von Eiweißabbauprodukten oder mit anderen Worten das weitere Fortschreiten der Peptonisation der Eiweißkugeln muß sich aber an dem freien Zellende in einer weiteren osmotischen Dehnung äußern. Hierdurch wird abermals die Konzentration der Abbauprodukte herabgesetzt, damit das Gleichgewicht gestört und das Spiel wiederholt sich so ununterbrochen bis zum Aufbrauch der Eiweißkugeln, wenn nicht durch erneute Nahrungsaufnahme und Resorption der im Darmtraktus gebildeten Eiweißspaltprodukte die Konzentration der Stoffe an den beiden Enden der Reaktionsbahn zugunsten der aufbauenden Phase des reversibeln Prozesses verschoben wird, womit zugleich eine Verminderung des Zellvolumens einhergeht. Gegenüber der unbehinderten osmotischen Dehnung am freien Zellende vermag der basale, durch die angrenzenden Zellen an der räumlichen Ausdehnung verhinderte Teil nur sekundär eine geringe Konzentrationsverminderung durch Abfluß der Spaltprodukte herbeizuführen. Daher tritt erst dann eine stärkere Peptonisation der Eiweißkugeln dieses Teiles auf, wenn der Abbau am freien Ende soweit vorgeschritten ist, daß das Gleichgewicht nicht mehr von seiten der erstbetroffenen Eiweißkugeln wiederhergestellt werden kann. Dann strömen die im basalen Teil noch angesammelten, die weitere Spaltung hemmenden Abbauprodukte ebenfalls gegen das freie Ende ab, verursachen ihrerseits eine weitere Dehnung der Membran und den Nachschub von Spaltprodukten, bis im Hunger auch die Eiweißkugeln des Basalteiles der Zellen der Peptonisation vollständig verfallen sind.

Der reversible endoenzymatische Eiweißumsatz steht aber auch zu den morphologischen Differenzen der Zellen, die der aufbauenden und der abbauenden Phase entsprechen, im Verhältnis wie Ursache und Wirkung. Wie eng dieser Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur osmotischen Dehnung und zum Abbau der Eiweißkugeln ist, geht aus dem Vergleich der Lagerungsverhältnisse der großen, frei endigenden Zellen mit vorgeschrittenem Eiweißabbau und der kleinen,

allseitig von anderen Zellen umschlossenen und daher an der Volumenzunahme verhinderten Zellen hervor. Damit fehlt den kleinen Zellen das die Peptonisation der Eiweißkugeln auslösende Moment: die Konzentrationsabnahme der hemmenden Eiweißspaltprodukte.

Sie vermag erst dann einzusetzen, wenn die kleinen Zellen durch das Zugrundegehen der großen frei werden und sich nun ihrerseits in demselben Sinne zu entwickeln vermögen. Das Zugrundegehen der großen Zellen erfolgt, wenn die Ansammlung der Eiweißspaltprodukte einen solchen Grad erreicht hat, daß die Membran dem osmotischen Druck nicht mehr standzuhalten vermag. An Stelle einer weiteren Dehnung, zu der die Zellhaut nicht über ein gewisses, durch die jeweiligen Elastizitätsverhältnisse bestimmtes Maß hinaus befähigt ist, zerreißt die Membran und der Inhalt der großen Zellen ergießt sich als verdauendes Sekret in das Lumen der Leberdrüenschläuche und der Mitteldarmdivertikel überhaupt. Die Endoenzyme sind durch das Platzen der Zellen frei geworden und dienen, wie dies schon bei den Krustazeen angegeben wurde, der exoenzymatischen Ueberführung der Nahrung in resorbierbare Spaltstücke. Die mit den Endoenzymen entleerten Produkte der intrazellulären Peptonisation gelangen ebenfalls zur Resorption. Hinsichtlich des Schicksals dieser aus den Eiweißkugeln hervorgegangenen Stoffe ist auch Berlese zu der Auffassung geführt worden, daß dieselben nach der Bildung durch die intrazelluläre Verdauung mit den abgestoßenen Zellen in Freiheit gesetzt werden und danach aufs neue zur Resorption gelangen. So sagt er: „Finita la digestione intracellulare la cellula si stacca ed i prodotti digeriti che contiene vengono assorbiti o nella ghiandola stessa o nel colon seguente.“

Diese Beobachtung von Berlese ist großem Widerspruch begegnet; mußte es doch als ein durchaus überflüssiger Umweg erscheinen, daß in Form der Eiweißkugeln deponierte Reservestoffe zunächst intrazellulär verdaut, dann in den Verdauungskanal abgestoßen und danach erst wieder resorbiert werden sollten. Erfäßt man aber die in den Epithelzellen der Leberschläuche vor sich gehende intrazelluläre Verdauung des daselbst deponierten Eiweißes in ihrer ursächlichen Beziehung zur Sekretbildung, so besitzt das Freiwerden der Spaltprodukte, ihr Auftreten im Verdauungstraktus und ihre nachträgliche Resorption nur die Bedeutung einer belanglosen Begleiterscheinung. Die funktionelle Bedeutung der Spaltprodukte als sekretionsbedingendes Moment erlischt mit dem Freiwerden der Endoenzyme aus den Zellen und beginnt erst wieder nach ihrer Resorption zugleich mit den neugebildeten Verdauungsprodukten.

Soweit der Organismus die Resorptionsprodukte nicht direkt verwendet, kommen dieselben zur Deponierung und der in den Epithelzellen der Leberdrüenschläuche und der Divertikel überhaupt deponierte Anteil verfällt dann aufs neue der intrazellulären Verdauung, die, wie ausgeführt wurde, das Freiwerden der Endoenzyme als verdauendes Sekret im Gefolge hat, sobald die Zellmembran dem osmotischen Druck der Spaltprodukte nicht mehr Widerstand zu leisten vermag. Es gilt dieser Modus der Sekretbildung für solche Fälle, wo der deponierte Reservestoff nicht durch ein ausgebildetes Grenzhäutchen von Plasma getrennt wird, so daß die Spaltprodukte bei ihrer freien Diffusion in der Zellmembran den ersten Widerstand finden. Beim Fehlen des Grenzhäutchens kann sich auch noch ein anderer Typus der Sekretbildung entwickeln, bei dem es zum Platzen der Zellmembran erst im Verdauungstraktus durch die Ablösung der Zellkuppen kommt. Es dürfte dies eintreffen, wenn der basale, von anderen Zellen begrenzte Teil relativ schmal und die Volumenvergrößerung der freien Kuppen der Epithelzellen beträchtlich ist. Die Konzentrationsdifferenzen der beiden Zellteile, wie auch die Tendenz des zähflüssigen Protoplasmas, in freiem Zustand Kugelgestalt anzunehmen, sind Faktoren, die zu einer immer tieferen Einschnürung und schließlich zur Abtrennung führen können. Haben sich Grenzhäutchen zwischen den Zelleinschlüssen und dem Protoplasma ausgebildet, so bedingt die Undurchlässigkeit dieser Haptogenmembranen, daß sich zunächst die intrazelluläre Verdauung im Innern der um jeden Einschuß gebildeten Haptogenmembran unter dem Einfluß der Endoenzyme vollzieht. Diesen Typus repräsentieren abgelöste und daher abgerundete Zellen aus einem Darmdivertikel von *Trombidium fuliginosum* (Abb. 2, S. 409). Die Substanz der Eiweißkugeln zeigt dabei die typischen Erscheinungen der Proteolyse. Aus dem festen Material werden allmählich zähflüssige, in Wasser aufquellende Tropfen, in deren Innerm sich, wie das Beispiel von *Trombidium* zeigt, stark lichtbrechende, gelbbraune Kügelchen finden, die als Fermentträger angesprochen werden. Die in Lösung gegangenen, membranimpermeablen Spaltprodukte haben zugleich eine osmotische Dehnung des Grenzhäutchens bewirkt, wodurch es zu der Bildung von Fermenttröpfchen und Fett oder Eiweißspaltprodukte enthaltenden Sekretbläschen im Zellinnern gekommen ist. Es ist ein ähnliches Bild wie bei den Krustazeen. Infolge einer zu starken osmotischen Dehnung platzen manche Sekretbläschen und die neben den sichtbaren Fermentgranula frei werden, gelösten Spaltprodukte bewirken dann auch an der Zellmembran

selbst die osmotische Dehnung, welche zum Platzen der Zellmembran führt, bevor oder nachdem es zur Abschnürung der ganzen Zelle oder der Zellkuppen gekommen ist.

Die im vorigen im einzelnen dargelegte Auffassung, daß resorptive und sekretive (wie auch exkretive) Funktionen der Leberzellen in ursächlichem Zusammenhang stehen, gibt auch bei anderen Klassen der Wirbellosen eine Möglichkeit an die Hand, scheinbar weit auseinander liegende physiologische Deutungen von Zelleinschlüssen zueinander in Beziehung zu bringen. Es gilt dies unter anderem für die Auffassung von Frenzel, daß die in den Epithelzellen des Mitteldarms von Tenebriolarven und zahlreichen anderen Insekten aufgefundenen Kristalloide enthaltenden Proteinkörner und Proteinklumpchen als Sekrete aufzufassen seien, während demgegenüber Biedermann derartige Einschlüsse als Produkte der resorptiven Tätigkeit des Mitteldarmepithels und dementsprechend als gespeichertes, häufig kristallinisches Reserveeiweiß betrachtet¹⁾. Ist meine Ansicht über das Wesen der Sekretbildung richtig, so haben beide Forscher recht. Resorption und Speicherung von Reserveeiweiß in den Darmepithelzellen liefern das Substrat für den endoenzymatischen Verdauungsprozeß. Dieser aber erzeugt die osmotisch wirksamen Spaltprodukte, die letzten Endes zum Untergang der Zelle führen und damit zum Freiwerden der Endoenzyme, die hierdurch den Charakter von Verdauungssekreten erlangen. Da z. B. beim Mehlwurm die Proteinklumpchen im Hunger auf Kosten der Proteinkörner zunehmen, die ihrerseits am reichlichsten bei der Fütterung mit Mehl auftreten, so gewinnt man den Eindruck, daß die Proteinklumpchen durch den intrazellulären Verdauungsprozeß angegriffene Proteinkörner sind. Auch die variierende Form und Größe vieler Einschlüsse kann eine Folge der endoenzymatischen Proteolyse sein. Mit der Größe der Einschlüsse variiert auch die Menge der entstehenden Spaltprodukte und damit die Intensität der osmotischen Aenderungen, welche sich in der betroffenen Zelle vollziehen. Sind dieselben sehr stark, so bedingen sie den raschen Untergang der Zellen, wie dies Frenzel häufig beobachtet hat. In anderen, bei Insekten zahlreichen Fällen sind die Zellen eine Zeitlang befähigt, die Folgen der Hypertonie zu überstehen. Sie vermögen dann des öfteren Sekretbläschen an das Darmlumen abzugeben. Die relative Resistenz der Epithelzellen des Mitteldarms hängt vielleicht damit zusammen, daß es sich hier häufig um feste

¹⁾ Siehe über diese Frage Biedermann, in Wintersteins Handbuch d. vergl. Physiol. Bd. 2, 1 Hälfte II. Teil (Jena 1910) 761. 762.

Verbände handelt, bei denen die einzelnen langen, schmalen Zellen palisadenförmig nebeneinander gelagert sind. Die freie Oberfläche, an der sich die osmotischen Aenderungen geltend machen, ist daher relativ gering. Bei gleichmäßig dehnbaren Membranen vermag sich die Hyperosmose in mehr oder weniger starken Vorwölbungen der gegen das Darmlumen zu gerichteten freien Oberfläche der Zellen zu äußern; so bei den Larven von *Aeschna* und *Libellula*. Hierdurch erhält die bei den erwähnten Insektenlarven im Ruhezustand ebene Innenfläche des Darms ein gefaltetes Aussehen. Gibt schließlich die Membran nach unter Freiwerden der, wie früher beschrieben, gebildeten Sekretbläschen, so repräsentiert die abgehobene Kutikula einen zusammenhängenden Ueberzug, der den Verband der Epithelzellen auch dann noch eine Zeitlang vor Desorganisation schützt, wenn den ersten Sekretbläschen weitere gefolgt sind. Immerhin gehen die Zellen im Verlauf der fortgesetzten Sekretabgabe allmählich zugrunde und das abgestorbene Eiweiß verfällt der Autolyse unter dem Einfluß noch vorhandener Endoenzyme. An die Stelle dieser Zellen treten die basal zwischen ihnen eingelagerten Ersatzzellen. Diese Jugendformen ließen sich in ihrer räumlichen Beengung vielleicht als Zellen auffassen, die sich, gezwungen durch die Konzentrationsverhältnisse der resorbierten Spaltprodukte, in der synthetischen Phase befinden. An diesen Ersatzzellen vollziehen sich nun dieselben Aenderungen. Mit ihrer Ausbildung kommt es aufs neue zur Sekretbildung und zum Abheben der Kutikula usw. Neue Ersatzzellen versehen immer wieder die Rolle der zugrunde gehenden und erleiden dasselbe Schicksal wie diese. Man kommt so ganz von selbst zu Bildungen, die in bezug auf ihren lamellenösen Bau, auf ihre kristallinen Einschlüsse, auf ihre verdauenden und zugleich Reservematerial darstellenden Qualitäten, auf ihre Lage zwischen Darmepithelzellen und Darmkontenta usw. dem für die Insekten charakteristischen Gebilde der „peritrophischen Membran“ entsprechen. In der Tat ist auch von Voinov¹⁾ ein derartiger Ursprung der peritrophischen Membran angenommen worden. Diese aus chitinähnlichen Lamellen und dazwischen geschichteten Eiweißlagen aufgebaute, gallertige Membran stellt wie ihr Analogon, der Kristallstiel der Lamellibranchier und gewisser Schnecken, in gleicher Weise eine Fermentanhäufung wie eine Eiweißreserve dar (Biedermann).

Hier wie dort handelt es sich bei den Aenderungen, die diese aus zerfallenden Zellverbänden hervorgehenden Gebilde unter variierenden Bedingungen erleiden, um Vorgänge, die sich prinzipiell in keiner

¹⁾ Voinov, Bull. de la Soc. des Sc. de Bucarest 7 (1898) Nr. 6.

Weise von den intrazellulären Wechselwirkungen unterscheiden, welche jene Fermente auf die entsprechenden Substrate der Zelle auszuüben vermögen. Hier wie dort werden diese Wirkungen beherrscht durch das Massenwirkungsgesetz, durch die Konzentrationen an den beiden Enden der Bahn einer reversibeln Reaktion. Wie die Endoenzyme Eiweiß, Fett und Polysaccharide zu Zeiten reichlicher Ernährung aus den resorbierten Spaltprodukten der Nahrungsstoffe synthetisieren und als Reservematerial deponieren, wie sie umgekehrt im Hunger die deponierten Stoffe wieder angreifen und deren Aufzehrung beschleunigen, so vermögen auch, losgelöst vom Zellverband, die zum Verdauungsssekret gewordenen Endoenzyme auf Zelltrümmer und Nahrungsstoffe als Substrat, je nach den Konzentrationsbedingungen, im aufbauenden oder im abbauenden Sinne einzuwirken. Zu Zeiten des Nahrungsmangels beobachtet man ein Schwinden des Kristallstiels und eine entsprechende Reduktion an peritrophischen Membranen. Umgekehrt wachsen die Kristallstiele zu Zeiten reichlicher Fütterung. Aber auch die einzelnen Partien dieser eigenartigen Gebilde verhalten sich je nach ihrer Lagerung ungleich. So befinden sich Kristallstiele an dem frei in den Magen hineinragenden Ende beständig im Zustand der Verflüssigung und dasselbe Bild gewähren peritrophische Membranen in ihrer das Darmlumen unmittelbar begrenzenden Schicht.

Abgesehen davon, daß die Autolyse der abgelösten Epithelschichten hier am längsten gewährt hat, so daß der Grad der Selbstverdauung in diesen zuerst abgelösten Epithelien am vorgeschrittensten ist, sind auch die Bedingungen für ein rasches Wegschaffen der Spaltprodukte in diesen Teilen am ehesten erfüllt. Demgegenüber kommt es in Teilen des Kristallstiels, die in einem besonderen Coecum eingeschlossen sind oder die die eine Hälfte eines durch Verdickungen der Darmwand längsgeteilten Darmes ausfüllen resp. bei den vom Darmlumen entfernteren Partien der peritrophischen Membran zu einer Anhäufung der Spaltprodukte, die die Verdauung des Kristallstieles und das Fortschreiten der Autolyse der Ablösungsschichten bei der peritrophischen Membran verhindert. Beim Kristallstiel hält die Hemmung an, bis durch längeren Hunger, z. B. während des Winters oder bei künstlichem Nahrungsentzug — durch Halten der Tiere in filtriertem Seewasser —, die Spaltprodukte auch in den schwer zugänglichen Coeca vom Organismus aufgezehrt werden. Ein vom Coecum eingeschlossener Kristallstiel verhält sich ähnlich wie ein mit koaguliertem Eiweiß gefülltes Glasröhrchen bei der Pepsinbestimmung nach Mett. Während die ursprüngliche Oberfläche leicht vom Pepsin an-

gegriffen wird, geht die Verflüssigung des Eiweißzylinders mit fortschreitender Verdauung in dem Maß langsamer vor sich, als mit der Entfernung der freien Eiweißoberfläche vom Rand des Röhrchens die Diffusion der hemmenden Abbauprodukte nach außen unvollständiger wird. Auch kann in zu konzentrierten Pepsinlösungen eine Spaltung, wegen der Anhäufung nicht rasch genug diffundierender Verdauungsprodukte, vollständig ausbleiben. Wahrscheinlich sind bei solchen Hemmungserscheinungen, außer der Bildung echter Gleichgewichte, auch sog. falsche Gleichgewichte beteiligt, bei denen die Spaltprodukte bindend auf die Enzyme wirken und sie hierdurch ihrem Wirkungsfeld entziehen.

Nach dem Vorausgeschickten würde es sich also bei der Bildung und der Auflösung des Kristallstiels der Muscheln und analoger Gebilde um zwei entgegengerichtete Phasen einer reversibeln Reaktion handeln: einer Eiweißsynthese aus den Abbauprodukten bei reichlicher Ernährung, einer Eiweißspaltung dagegen bei Aufbrauch der Spaltprodukte im Hunger. Gegen meine Auffassung könnte man vielleicht einwenden, daß in den Kristallstielen zwar sehr viel Diastase und Invertase, aber gerade keine Protease aufgefunden worden ist. Gegen das Fehlen einer Protease spricht aber das Verhalten des globulinartigen Eiweißes, aus welchem der Kristallstiel aufgebaut ist. Denn sein Verschwinden in vivo beweist, nicht minder als eine proteolytische Wirkung gegenüber irgendwelchem fremden Eiweiß, die Tätigkeit einer Protease im Verdauungstraktus der Lamellibranchier.

Um einiges komplizierter verlaufen die zur Sekretbildung führenden Vorgänge in der Leber der Mollusken. Daß es sich jedoch auch hier um keine prinzipiellen Differenzen gegenüber den anderen Wirbellosen handelt, zeigt schon der äußere Befund und die chemische Untersuchung der Mitteldarmdrüse der Cephalopoden. Die weiche, beinahe zerfließliche Masse, die diese für die Bildung von Verdauungsssekret fast allein in Betracht kommende Drüse darstellt, und die großen Mengen an Eiweißspaltprodukten: Peptonen und Leuzin, die sich durch Wasser direkt aus der Cephalopodenleber extrahieren lassen (und die bei der aseptischen Autodigestion der Wasserextrakte noch durch Tyrosin, Lysin, Histidin und Arginin vermehrt werden), erwecken den Eindruck eines in lebhafter autolytischer Zersetzung begriffenen Organs. Daß hier Spaltprozesse vor sich gehen, die in großem Umfang zur Zerstörung des Lebergewebes führen, beweisen außer den erwähnten ungeformten Abbauprodukten die in dem braunen, nüchtern abgesonderten Sekret enthaltenen Zelltrümmer, deren Vakuolen braune oder

rote Konkretionen führen. Die ovoiden — Körner, Kugeln und nadel-förmige Kristalle enthaltenden — Massen sind gleicher Art wie die in den Zellen des Leberepithels aufgefundenen.

Cuénot¹⁾ hat außer den auch hier festgestellten basal eingelagerten sog. Kalkzellen und den Ersatzzellen zwei große Zellformen, die „Cellules à boules“ und die „Cellules vacuolaires“ beschrieben (Abb. 3, Tafel II). Außer einer endständigen Vakuole, welche Tyrosin oder dem Tyrosin analog kristallisierende Nadeln und körnige sowie kugelige, vielleicht aus Leuzin bestehende Einschlüsse enthält, weisen die „Cellules à boules“ zahlreiche Fetttröpfchen und kleine saphranophile Bläschen auf. Die „Cellules vacuolaires“ enthalten dagegen außer dem Zellkern nur eine sehr große, endständige, rote und braune Granula und eine entsprechend gefärbte Flüssigkeit einschließende Vakuole. Daß von den Tieren aufgenommene Farbstoffe nur die „Cellules vacuolaires“ färben, scheint mir eine einfache Folge des Umstandes zu sein, daß die „Cellules vacuolaires“ vollständig abgestorbene Zellen repräsentieren, die von allen Farbstoffen angefärbt werden, während nur die als Vitalfarbstoffe bekannten basischen Farbstoffe auch in die lebenden Zellen einzudringen vermögen. (Beiläufig bemerkt sind aus diesem Grunde Schlüsse gegen die Gültigkeit der Overtonschen Vitalfarbstofftheorie, die auf Grund der Färbbarkeit von Drüsenzellen mit Nichtvitalfarbstoffen gezogen worden sind, nicht bindend, da es abgestorbene Zellen sein dürften, die gefärbt werden.) Auch andere vom Organismus nicht verwertbare Stoffe können daher auf dem Wege über solche abgestorbene, bald völlig zerfallende und mit ihrem gesamten Inhalt entlassene Zellen ausgeschieden werden. Damit erlangen diese „Cellules vacuolaires“ die funktionelle Bedeutung von exkretorischen Elementen. Aber es muß festgehalten werden, daß dieser Zustand im wesentlichen nur den Abschluß einer Entwicklungsphase darstellt, den die anderen Zellen früher oder später ebenfalls erreichen können, auch wenn im einzelnen bestimmte, durch die Natur der Einschlüsse bedingte Differenzen bestehen.

Wie wir bei Krustazeen und Arachniden basal zwischen den Fermentzellen eingelagerte Ersatzzellen finden, die wir als Sitz der synthetischen Phase angenommen haben, so finden wir auch hier in gleicher Lagerung solche Ersatzzellen vor, denen man daher dieselbe Funktion zuschreiben kann. Die Ersatzzellen gehen aus der synthetischen in die abbauende Phase über, welche zum Untergang der Zellen und damit zum Freiwerden der Endoenzyme, dem Ver-

¹⁾ Cuénot, Archives de Biol. 16 (1899) 49; Archives de Zool. exp. (4) 7 (1907) 227.

Tafel II.

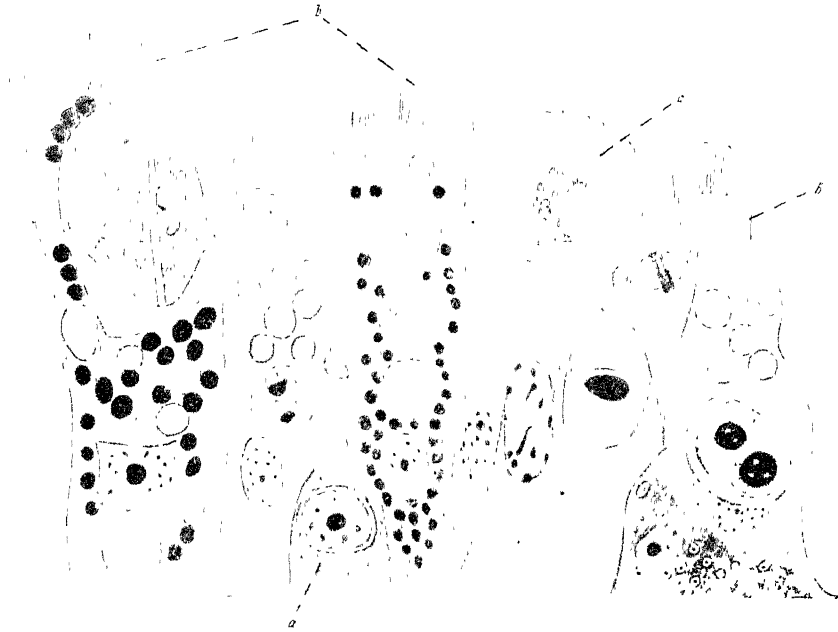


Abb. 3 Leber epithel von *Sepia officinalis*: a = Ersatzzelle, b = „cellules à boules“; c = „cellules vacolaires“ (Nach Cuenot)

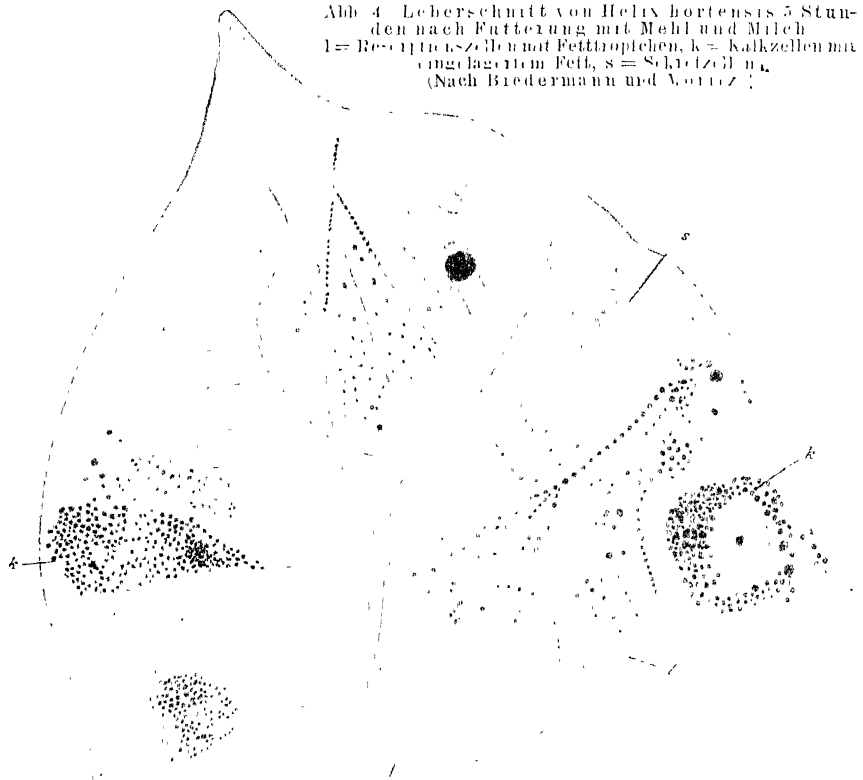


Abb. 4 Leberschnitt von *Helix hortensis* 5 Stunden nach Fütterung mit Mehl und Milch
l = Receptorzelle mit Fetttropfen, k = Kalkzellen mit eingelagertem Fett, s = Sekretzellen.
(Nach Biedermann und Vortiz)

dauungssekrete führt, sobald die Fermentzellen durch die Hyperosmose der gebildeten Spaltprodukte zerstört worden sind und die basalen Zellelemente damit die, für die mit der Volumenvergrößerung einhergehende Spaltung notwendige Bewegungsfreiheit erlangen.

Bei den Heliziden können wir deutlich zwei verschiedene sekretbildende Zellen in der als Leber bezeichneten Mitteldarmdrüse auseinanderhalten: die gefärbten sog. Sekretzellen und die farblosen Resorptionszellen. Die Unterschiede wären bedingt durch die Natur der, der endoenzymatischen Spaltung unterliegenden, Zelleinschlüsse. Die intensiv gefärbten Ballen könnten die ersten Umwandlungsprodukte geformter Partikel, z. B. Chlorophyllkörner, der aufgenommenen Nahrung sein, die in Zellen der Gastropodenleber durch deren phagozytäre Tätigkeit hineingelangen. Dasselbst würden sie der intrazellulären Verdauung anheimfallen, die zur Bildung des braunen Sekretes führt. Die Resorptionszellen dagegen, die den „Cellules à boules“ der Cephalopodenleber an die Seite zu stellen wären, würden in ihrem, durch den osmotischen Druck der Spaltprodukte keulenförmig erweiterten freien Ende im wesentlichen die endoenzymatische Spaltung des resorbierten und deponierten Fettes, sowie der vorhandenen Kohlenhydrate vermitteln. Demgegenüber wären der basale Teil der Resorptionszellen und die angrenzenden Kalkzellen als Orte der Fettsynthese zu betrachten. (S. Tafel II, Abb. 4.) Die Kalkzellen würden funktionell mit den Resorptionszellen in dem Sinn zusammenhängen, als die beiden Funktionen den entgegengesetzten Phasen einer und derselben reversibeln Reaktion entsprechen. Eine analoge Beziehung besteht hinsichtlich der Glykogenfunktion zwischen dem glykogenspeichernden Bindegewebe, wie auch den Kalkzellen und dem freien Ende der Resorptionszellen, in dem sich Fett- und Glykogenspaltung vollziehen. Die intrazellulären Spaltprozesse führen dann unter den bekannten Erscheinungen der Hyperosmose zur Bildung von Sekretbläschen, zu deren Platzen in und außerhalb der Zellen, zum schließlichen Zugrundegehen dieser letzteren und zum Freiwerden der Endoenzyme als Verdauungssekret.

Die hier vertretene Auffassung führt folgerichtig zur Annahme zweier Sekrete: eines braungefärbten, das den sog. Sekretzellen entstammt und eines farblosen, welches von den Resorptionszellen gebildet wird. Mit dieser Forderung der Theorie finden nun eigentümliche Befunde ihre Erklärung, die sich für die Leber von *Limax flavus* schon auf Claude Bernard¹⁾ zurückführen und die ihr Gegen-

¹⁾ Claude Bernard, Ann. de Sc. nat. zool. (3) 19 (1853) 331.

stück in Befunden von Paul Bert, Bourquelot, Falloise u. a. an der Cephalopodenleber besitzen¹⁾. Die Theorie verlangt, daß bald nach erfolgter Resorption der in die Leberschläuche gelangten Verdauungsprodukte und unmittelbar nach der stattgefundenen Resynthese die Spaltung sich geltend macht, deren Folge die Bildung eines, den farblosen Produkten der Resynthese entsprechenden, farblosen Sekretes wäre. Dieses Sekret muß neben Endoenzymen der Zelle die Spaltprodukte von Fett und Glykogen, eventuell auch außerdem von Eiweiß, enthalten: also Fettsäuren, Glyzerin, Zucker (Maltose oder Glukose), und eventuell Peptone oder Aminosäuren. Tatsächlich ist das während der Resorptionsperiode ergossene Sekret zucker- und peptonhaltig. Auch reagiert das Sekret bei Tieren in gutem Ernährungszustand (während des Sommers) sauer. Nebenbei sei bemerkt, daß wohl überhaupt in sehr vielen Fällen eine saure Reaktion der Verdauungssekrete bei Wirbellosen auf das Konto einer endoenzymatischen Fettspaltung (und den Uebertritt der abgespaltenen Fettsäuren mit dem Sekret in den Verdauungstraktus) zu setzen ist. Dieses gefärbte Sekret, welches im Sinne unserer Ausführungen den Sekretzellen entstammt, verbleibt im Darm bis zur folgenden Nahrungsaufnahme.

Das Wesentliche und prinzipiell Gleichartige über die Sekretbildung bei den Wirbellosen sei in den nachfolgenden Sätzen kurz zusammengefaßt:

1. Verdauungssekrete sind freigewordene Endoenzyme der Epithelzellen des Mitteldarmes selbst oder drüsenartiger Ausstülpungen desselben, der Divertikel und Leberschläuche.

2. Die Endoenzyme werden frei und erhalten damit den Charakter von Verdauungssekreten, wenn die betreffenden Zellen zugrunde gehen.

3. Die Zellen gehen, wie im einzelnen beschrieben wurde, zugrunde infolge der Hypertonie, veranlaßt durch die intrazelluläre Anhäufung von Spaltprodukten der endoenzymatischen Verdauung von in den Zellen deponiertem Reserveeiweiß, Fett oder Kohlehydrat.

4. Reserveeiweiß, Fett und Kohlehydrat bilden sich aus resorbierten Spaltprodukten als Folge der synthetisierenden Wirkung derselben Endoenzyme, welche unter anderen Konzentrationsbedingungen

¹⁾ Paul Bert, *Extraits de Mém. de la Soc. de Sciences phys. et nat. de Bordeaux* 5 (1857); *Compt. rend.* 65 (1867) 300; Bourquelot, *Compt. rend.* 93 (1881) 978; 95 (1882) 1174; *Archives de Zool. exp.* (2) 3 (1882) 385; Falloise, *Archives internat. de Physiol.* 3 (1906).

an den Endpunkten der Reaktionsbahn die Spaltung dieser Produkte und damit die Sekretbildung bedingen.

5. Die Prozesse der Resorption von Verdauungsprodukten, der Synthese und Deponierung von Reservestoffen in den Epithelzellen des Verdauungskanal und der Anhangsdrüsen hängen wie Ursache und Wirkung zusammen mit den Prozessen der intrazellulären Spaltung der Reservestoffe, der Sekretbildung und der Verdauung im Magen-Darmkanal.

Im Anschluß an das soeben Ausgeführte sei die Frage gestreift, wie sich die Sekretbildung bei den Wirbeltieren, speziell bei den höheren Wirbeltieren in jenem Organ gestaltet, das sekretorisch als Analogon der „Leber“ der Wirbellosen zu betrachten ist, in der Pankreasdrüse. Leider kann diese Frage nicht mit wenig Worten behandelt werden, denn vor uns türmt sich Problem um Problem. Eine Hauptkomplikation ist durch den Umstand geschaffen, daß nicht, wie bei den Wirbellosen, die Resorption der Verdauungsprodukte vom Verdauungstraktus aus erfolgt. Vielleicht könnte der Schluß gezogen werden, daß die Resorption hier trotzdem stattfindet und zwar durch Zuführung der Spaltprodukte des Kohlehydratstoffwechsels durch das Blut. Als Orte der Resorption und Synthese wären dann wohl die Langerhansschen Inseln zu betrachten, durch welche die Blutgefäße in der Weise verlaufen, daß sie ringsum von diesen intertubulären Zellhaufen umgeben sind. Wir stoßen hier mit der Diskussion einer Resorption von Glukose und deren Synthese zu Glykogen in den Langerhansschen Inseln auf die Frage nach der Rolle der Pankreasdrüse im Zuckerstoffwechsel, wir stoßen auf das Rätsel der inneren Sekretion. Man möchte danach versucht sein, beim Pankreas und bei einzelnen anderen Organen mit „innerer Sekretion“, bei denen histologische Unterschiede innerhalb der Drüse auch funktionell verschiedene Organteile erwarten lassen, das „innere Sekret“ als etwas Negatives aufzufassen, d. h. als die Fortnahme, die Resorption eines Stoffes — bei der Pankreasdrüse des Zuckers — aus dem Blut. Nach der traditionellen Vorstellung über die innere Sekretion wäre es dagegen ausschließlich ein Substanzzuwachs, den das Blut durch die Drüse mit „innerer Sekretion“ erfährt. Im Falle der Pankreasdrüse könnte man z. B. ein „glykolytisches Enzym“ annehmen, dem dann die Aufgabe zukäme, den Zucker aus dem Blut zu eliminieren. Dasselbe würde aber auch eine glukoseresorbierende Funktion der Pankreasdrüse leisten und es ist ohne weiteres klar, daß bei einem Ausfall dieser Funktion Hyperglykämie die notwendige Folge wäre. Damit soll jedoch nicht be-

hauptet werden, daß es nicht auch echte innere Sekrete, die also mit einer Substanzabgabe an das Blut verbunden sind, gibt. Vorerst liegt es nahe, den Unterschied, wie er z. B. zwischen Thyreoidea und Parathyreoidea besteht, gerade darin zu erblicken, daß die erstere Substanz die Produkte einer endoenzymatischen Spaltung an das Blut abgibt, also ein echtes Sekret, während die Parathyreoidea Sitz der resorbierenden und synthetisierenden Phase wäre. Die letztere würde, wie dies für die Langerhansschen Inseln vermutet wurde, dem Blut Substanz entziehen. Hier würde also Substanzabgabe und Substanzenzug ausschließlich das Blut betreffen, während bei der gewissermaßen zwischen Blut und Darm eingeschalteten Pankreasdrüse die positive Sekretion dem Verdauungstraktus, die negative (innere) Sekretion dem Blut zugute käme. Im Sinne der Auffassung, daß es sich bei der letzteren um einen Substanzenzug handeln könnte, erschiene auch die früher gestreifte Lehre von den positiven und negativen Hormonen in einem neuen Licht. Doch muß ich mir den Versuch versagen, mich in dieses geheimnisvollste Reich der Forschung vorzuwagen, da fast auf der ganzen Linie eine völlig neue gedankliche Einstellung notwendig wäre, da zudem die tatsächlichen Grundlagen spärlich sind und sich z. B. die Diabetesheilung mit dem Extrakt der Langerhansschen Inseln, dem Insulin, eher mit der Annahme eines echten inneren Sekretes als mit einem Substanzenzug aus dem Blut durch diesen Organteil verträgt.

Die Sekretionstheorie der Antikörperproduktion. Der vorliegende Abschnitt, der von der Sekretbildung handelt, kann nicht abgeschlossen werden, ohne der geistvollen Theorie von Sahli¹⁾ über den sekretiven Ursprung der Antikörper zu gedenken. Nach Sahli wären die Antikörper normale Blutbestandteile, in verschiedener, offenbar ihrer physiologischen Bedeutung jeweiligen angepaßten Menge. Gelangt nun ein Antigen, d. h. also eine zur Bildung spezifischer Antikörper befähigte Substanz in das Blut, so bindet es den ihm entsprechenden Partner unter den normalen Blutbestandteilen und dies bedingt automatisch den sekretiven Nachschub des eliminierten Stoffes, sei es aus den blutbildenden Organen — Knochenmark, Milz²⁾

¹⁾ Sahli, Schweiz. med. Wochenschr. Nr. 50 und 51 (S. 1—62 des Separatabdrucks).

²⁾ Siehe Sahli, S. 47. Detre Deutsch (1909) hat gezeigt, daß die Entfernung der Milz einige Tage nach der Injektion des Antigens die Antikörperbildung in schädlicher Weise beeinflußt, daß man jedoch nach Implantation der exstirpierten Milz bei einem normalen Tier das Auftreten der Antikörper gegen das in Frage kommende Antigen beobachten kann.

und Lymphdrüsen — oder aus irgend welchen anderen, zum Teil durch die Applikationsstelle bestimmten Geweben¹⁾. Dieser Ersatz eines Blutbestandteiles ist eine physiologische Notwendigkeit, wo es sich um Stoffe handelt, die im Haushalt des Organismus eine Rolle spielen. Aber auch ohne diese physiologische Notwendigkeit, bei an und für sich für den Organismus unwichtigen Stoffen, wie sie zweifellos unter der von Sahli angenommenen praktisch unendlich großen Zahl von Blutbestandteilen, die durch ein Antigen gebunden werden können und die damit den Charakter von Antikörpern erlangen würden, vorkommen, müßte die Blutzusammensetzung durch den Ersatz des verlorenen Bestandteiles konstant gehalten werden. Sahli hat hier den Vergleich mit dem Konstantbleiben des Blutzuckerspiegels gezogen, ein Vergleich, der um so wertvoller ist, als es sich bei diesem Vorgang um physikalisch-chemisch völlig durchsichtige Verhältnisse handelt, die, wenn der Vergleich zu Recht besteht, auch bestimmte Rückschlüsse auf den Mechanismus des Antikörperschubes zu ziehen gestatten. Das Hauptreservoir des Traubenzuckers im Blut repräsentiert bekanntlich das Leberglykogen, während der Blutzucker seinerseits das Nebenreservoir speist, als welches das in den Muskeln deponierte Glykogen zu betrachten ist. Sinkt z. B. infolge von Muskelarbeit am Ort des Verbrauchs die Konzentration an Traubenzucker, dessen chemische Energie in dem betreffenden Muskel in mechanische Energie umgesetzt wird, so bedingt dies sofort eine Nachlieferung des zerstörten Zuckers aus dem Glykogen nach dem Massenwirkungsgesetz, entsprechend der Gleichung: n Traubenzucker \rightleftharpoons Glykogen

$$\frac{C'}{C^n} = K,$$

worin C' die Konzentration des gelösten Glykogens, C die Konzentration des Traubenzuckers, n die Anzahl der aus 1 Glykogenmolekül gebildeten Traubenzuckermoleküle und K die Gleichgewichtskonstante bedeutet.

¹⁾ Bordet, loc. cit. S. 495 erwähnt die Beobachtung von Kraus u. Levaditi sowie Cantacuzène, daß die Einspritzung von Pferdeserum unter die Haut beim Kaninchen zunächst die Bildung von Präzipitin in Milz, Knochenmark und Lymphdrüsen — also in den blutbildenden Organen — hervorruft, während nach der Einspritzung desselben Serums in das Peritoneum das Präzipitin hauptsächlich im großen Netz und im Peritonealexsudat auftritt. Ferner zeigten Wassermann u. Citron, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 50, daß bei der Injektion von Typhusantigen in Blut, Pleura oder Peritonealhöhle der Antikörper im Blut, im Pleura- oder Peritonealexsudat prädominiert.

Das Gleichgewicht zwischen festem und gelöstem Glykogen wird in analoger Weise durch die Formel $\frac{C''}{C'} = K'$ geregelt, in der C'' das feste, C' das gelöste Glykogen bedeutet. Der durch die Traubenzuckerbildung bedingte Verlust an gelöstem Glykogen wird also seinerseits aus dem festen in den Muskeln deponierten Glykogen ersetzt. Das Glykogendepot eines Muskels stellt demnach gewissermaßen den Puffer dar, der die Schwankungen des Zuckergehaltes im Muskel, welche die Transformation von chemischer in mechanische Energie mit sich bringt, daran verhindert, sich im Blute fühlbar zu machen. Nach dem Aufbrauch des Muskelglykogens, z. B. infolge anhaltender Anstrengungen, sinkt jedoch sofort der Blutzuckerspiegel und diese Konzentrationsverminderung zieht nach dem Massenwirkungsgesetz eine Konzentrationsverminderung des gelösten Glykogens unmittelbar nach sich. Die Spaltung des gelösten Glykogens hat ebenso automatisch dessen Nachlieferung aus dem Glykogendepot der Leber zur Folge und solange solches vorhanden ist, muß auch die Blutzuckerkonzentration konstant bleiben. Umgekehrt bedingt die Zunahme der Zuckerkonzentration im Pfortaderblut nach Zuckeraufnahme durch die Nahrung die Vermehrung des gelösten und damit zugleich des in fester Form sich abscheidenden Glykogens, bis der dem Gleichgewicht zwischen Glykogenabbau und -aufbau entsprechende Blutzuckergehalt wieder erreicht ist.

Sahli hat diese Folgerung aus dem Massenwirkungsgesetz merkwürdigerweise nicht gezogen, sondern statt dessen erregende und hemmende Faktoren auf die Traubenzuckerproduktion in der Leber angenommen (siehe seine Erklärung S. 11 des Separatabdruckes loc. cit.). Daher und infolge der ganz auf die kolloidchemische Betrachtungsweise von Bordet eingestellten Auffassung ist auch die einfache Erklärung des Antikörpersnachtschubs auf dieser Grundlage nicht zu ihrem Recht gekommen. Und doch kann kein Zweifel darüber bestehen, daß das Massenwirkungsgesetz gerade einem Mechanismus zu genügen vermöchte, wie ihn die Sahlische Theorie vom Wesen und der Bildung der Antikörper zur Voraussetzung hat. Es schließt nur die, wie mir scheinen will, zweckmäßige Erweiterung in sich, daß jede Art der Eliminierung oder Konzentrationsverminderung¹⁾ eines als Antikörper in Betracht kommenden normalen Blut-

¹⁾ Erwähnt sei hier auch die von Sahli (loc. cit. S. 42 Fußnote 1) beobachtete Beseitigung der Hemmungswirkung von Autohämolyysin hemmenden Stoffen (bei hämolytischen Anämien) durch Verdünnung des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung).

bestandteiles automatisch dessen Nachlieferung zur Folge haben muß. Die Bindung, sei sie rein chemischer, oder sei sie, wie dies Sahli annimmt, kolloidchemischer bzw. adsorptiver Art, stellt nur einen möglichen Fall dieser Eliminierung dar. Wird z. B. das Antigen durch bestimmte lebende Bakterien repräsentiert, so wäre anzunehmen, daß sich diese aus dem Blut, das ihnen als Nährsubstrat dient, einen oder eventuell auch einige Stoffe herausholen, die ihnen besonders zusagen. Andersartige Bakterien würden wiederum andere Stoffe unter den ihnen gebotenen bevorzugen und der betreffende Nährstoff, auf dessen Ausnutzung in seinem Lebensprozeß ein bestimmtes Bakterium gewissermaßen spezifisch eingestellt ist (z. B. weil es gerade diesen Stoff zum Aufbau seiner Körpersubstanz benötigt), würde dann allein oder mit einem zeitlichen Vorsprung vor der Verarbeitung anderer Nährsubstanzen vom Bakterium exoenzymatisch oder endoenzymatisch verwertet¹⁾. Durch die Eliminierung des betreffenden Blutbestandteiles (ganz unabhängig davon, ob er selbst im Haushalt des Organismus eine mehr oder weniger wichtige Funktion versieht), würde das Gleichgewicht gestört, und es käme zur Nachlieferung desselben aus deponiertem Reservematerial oder aus der lebendigen Substanz der Körperzellen selbst. Von allem für die Antikörperbildung in Frage kommenden lebendigen wie toten Material wäre anzunehmen, daß es sich im Zustand permanenten Abbaus und Wiederaufbaus „in einem sog. dynamischen Gleichgewicht“ befindet, wobei sich Abbau und Synthese nicht etwa nur auf einer Reaktionsbahn vollziehn. Es muß vielmehr vorausgesetzt werden, daß es sich bei den betreffenden Riesenmolekülen und kolloiden Molekülaggregaten um eine sehr große Zahl von Simultanreaktionen, die vom selben Substrate zehren, handelt. Desaggregations-, Depolymerisations- und hydrolytische Prozesse, sowie die entsprechenden reversibeln Reaktionen im Gebiet der Eiweißkörper, Fette und Kohlenhydrate verlaufen nebeneinander und jeder einzelnen entspricht ein besonderes Gleichgewicht. Theoretisch ist zu erwarten, daß gleichzeitig an den verschiedenen Stellen des Moleküls, bald hier, bald dort, z. B. eine Polypeptidbindung reißen und wieder geknüpft werden

¹⁾ Die eigentümliche Tatsache der Bildung anderer Antikörper bei der Verwendung von Bakterienstämmen derselben Art, die aber auf verschiedenen Nährböden gezüchtet worden sind, würde sich dann in einfacher Weise dadurch erklären, daß sich die betreffenden Bakterien auf die in ihrem Nährboden zu verarbeitenden Substanzen spezifisch eingestellt haben und die daher aus einem ihnen dargebotenen Nährstoffgemisch auch wieder diejenigen Komponenten herausholen, an die sie gewöhnt worden sind, d. h. an deren Verarbeitung sich ihr enzymatisches Rüstzeug anpassen mußte.

kann. Hierbei entstehen die verschiedenartigsten Spaltprodukte, die sich je nach den Chancen für die Sprengung des Moleküls in der betreffenden Richtung in größerer oder geringerer Menge zu bilden vermögen. Sie würden also den normalen Antikörpern des Blutes entsprechen, welche die Theorie von Sahli voraussetzt. Wird ihre Konzentration durch einen Aderlaß gleichmäßig herabgesetzt, so erfolgt ihre Regeneration durch eine gleichmäßige Beteiligung aller möglichen Spaltreaktionen. Wird, gleichviel nach welchem Modus, nur einer der auf der beschriebenen Basis entstandenen Antikörper eliminiert, so wird damit das Gleichgewicht auf der entsprechenden und nur auf dieser Reaktionsbahn allein gestört und das fragliche Substrat muß zur Wiederherstellung des Gleichgewichtes den eliminierten Stoff ersetzen. Dies ist gleichbedeutend mit einer Begünstigung des Zerfalls des betroffenen Substrates in jener Richtung, die zur Bildung des eliminierten Blutbestandteiles führt. Jedes Agens, das in die Blutbahn gelangt und die Fähigkeit besitzt, einen in diesem Mechanismus verketteten normalen Blutbestandteil, sei es durch Bindung, durch Spaltung oder durch Resorption, zu eliminieren, löst damit automatisch nach dem Massenwirkungsgesetz den Nachschub des betreffenden Stoffes, des Antikörpers, aus. Derselbe muß spezifischen Charakter tragen, weil eben nur der Verlauf jener Reaktion, der der Antikörper als Spaltprodukt angehört, von allen Reaktionsmöglichkeiten, die dem betroffenen Substrate offenstehen, der Natur der Sache nach begünstigt wird.

Man kann sich fragen, ob die bei der künstlichen Immunisierung so häufig beobachtete Anreicherung der Antikörper im immunisierten Tier nicht einer Erklärung des Antikörpernachschiebs nach dem Massenwirkungsgesetz zuwiderläuft. Betrachten wir daher diese Vorgänge etwas genauer: Zunächst ist zu bedenken, daß die Eliminierung irgend eines Spaltproduktes aus dem Reaktionsgleichgewicht lediglich den Verlauf der Substratspaltung in jener Richtung nach sich zieht, die unter anderem zu dem betreffenden Spaltprodukt führt. Der komplizierte Aufbau irgend eines Zellproteids muß es notwendigerweise mit sich bringen, daß auch im Bereiche einer einzigen Spaltrichtung neben jenem Abbauprodukt eine größere Zahl anderer Spaltstücke von gleicher, höherer und niedrigerer Molekulargröße entstehen. Alle diese Stoffe haben die Fähigkeit der spezifischen Hemmung jenes einen Spaltungsmodus, der die Veranlassung ihrer Bildung war, und würden daher als Antitoxine fungieren. Doch dürfte die Hemmungswirkung bei den einzelnen Abbauprodukten eine ungleich ausgeprägte sein, eine Ungleichheit, die geeignet wäre, die z. B. beim

Zusammenbringen von Diphtherietoxin mit Diphtherieantitoxin beobachteten Neutralisierungserscheinungen zu erklären. (Nicht eine heterogene, aus Teilgiften bestehende Zusammensetzung des Toxins, sondern vielmehr der gemischte, nicht einheitliche Charakter des Antitoxins könnte dieses von Ehrlich aufgefundene Phänomen verursachen.) Könnten sich die hemmenden Abbauprodukte am Ort ihres Entstehens ansammeln, so wären die Bedingungen zur Resynthese des zerfallenen Proteids gegeben. Das strömende Blut sorgt jedoch für die Wegschaffung der Abbauprodukte aus dem örtlichen Reaktionsgleichgewicht, während gleichzeitig das zerstörte zelluläre Material, z. B. auf dem Wege der Bildung von Ersatzzellen, wie bei der gewöhnlichen Sekretbildung nachgeliefert wird. Auf alle Fälle kann aber die Anreicherung an Antikörpern nicht über eine gewisse Konzentrationsgrenze hinaus getrieben werden, die dann erreicht ist, wenn sich gleichmäßig im ganzen Blut so viel Abbauprodukte angesammelt haben, daß die betreffende Spaltung nach dem Massenwirkungsgesetz völlig durch die rückläufige Reaktion kompensiert wird. Erst durch Entnahme von Blut und dessen antikörperfreiem Nachschub aus den Blutbildungsstätten kann die Antikörperproduktion beim immunisierten Tier auch ohne neue Antigeneinspritzung durch einfache Konzentrationsabnahme der hemmenden Stoffe in Gang gebracht werden, bis sich das Gleichgewicht zwischen Abbau und Resynthese wiederhergestellt hat.

Die im vorigen dargelegte Auffassung über das Wesen der Antikörperbildung würde gleichsam das inverse Analogon meiner früher skizzierten Hypothese über die Natur der Antikörper darstellen. Während ich die Bakterientoxine als die gegenüber einem lebenden Substrat zur Auswirkung kommenden spaltenden Fermente der pathogenen Bakterien betrachte und in dem hierdurch hervorgerufenen Zerfall von lebenswichtigem Gewebematerial in der dem betreffenden Ferment, dem Toxin, eigentümlichen Spaltungsrichtung das Wesen der spezifischen Noxe, wie das Wesen der spezifischen Antikörperbildung — eben der, einer Spaltung in bestimmter Richtung entsprechenden, die weitere Spaltung hemmenden Abbauprodukte — erblicke, würde im Sinne der soeben entwickelten Theorie das Antigen einen im Blut schon vorgebildeten Stoff eliminieren. Dadurch würde die lebenswichtige Substanz, z. B. ein Zellprotein, aus deren in bestimmter Richtung erfolgendem Zerfall jener Stoff hervorging, zur Nachlieferung gezwungen. Es würde damit also eine spezifische Spaltung von Gewebematerial begünstigt, die hier wie dort als das Wesen der spezifischen Noxe betrachtet werden könnte. Nach beiden Annahmen wären Noxe und Anti-

körperbildung aufs engste verknüpft durch den nämlichen spezifischen Spaltprozeß. In beiden Fällen könnten die Antikörper als die Spaltprodukte jener spezifischen Reaktion betrachtet werden. Nur wäre das eine Mal der Antikörper das primäre, schon im Blut vorgebildete Agens und erst seine Ausschaltung durch das eindringende Antigen würde die seine Nachlieferung bedingende spezifische Spaltungsreaktion und damit die Schädigung lebendiger Substanz mit sich bringen. Im andern Fall wäre die durch das Antigen veranlaßte Spaltung lebendigen Gewebematerials, also die Noxe, das Primäre und die Antikörper wären das Sekundäre, die notwendige Folge der stattgefundenen Spaltung. Ich muß jedoch nachdrücklich betonen, daß ich, veranlaßt durch Sahlis Vergleich des Antikörperersatzes mit den Verhältnissen bei der Regulierung des Blutzuckerspiegels, im vorhergehenden dazu geführt worden bin, seine Theorie in einer stark modifizierten Fassung wiederzugeben, indem ich an Stelle von „Gesetzen der Erhaltung des Bestandes des Organismus und seiner Anpassung an das Bedürfnis“¹⁾ eine physiko-chemische Regulierungsursache, das Massenwirkungsgesetz, eingeführt habe. Damit zusammenhängend sehe ich das Wesen der Noxe nicht in der vorausgegangenen Eliminierung eines normalen Blutbestandteiles, sondern in deren Folgevorgang, der Spaltung von lebensnotwendigen Zellbestandteilen. Selbstverständlich halte ich es nicht für ausgeschlossen, daß schon die Eliminierung eines Blutbestandteiles an sich schädliche Folgen haben kann; aber dies wäre nur ein spezieller Fall unter vielen anderen, wo es sich lediglich um Spuren physiologisch so gut wie bedeutungsloser Stoffe handelt. Der Sekundärvorgang, die Spaltung, wäre aber in den zahlreichen Fällen schädlich, wo der Zellbestand des Organismus selbst davon betroffen wird²⁾.

Mit Rücksicht darauf, daß vielleicht die vorliegende modifizierte Wiedergabe seiner tiefdurchdachten Theorie Sahlis Intentionen durchaus nicht entspricht, möchte ich nicht verfehlen, das Wesentliche seiner Theorie mit seinen eigenen Worten hier folgen zu lassen³⁾:

„1. Der Organismus enthält schon physiologischerweise alle auf immunisatorischem Wege anreicherbaren Antikörper im Kolloidbestande seiner Körperflüssigkeiten (Blut, Gewebsflüssigkeiten, Lymphe) in ge-

¹⁾ Sahli, loc. cit. S. 12 und 13 des Separatabdrucks.

²⁾ Wird dagegen totes bzw. deponiertes Reservematerial, wie Glykogen oder Fett, von dem Spaltprozeß betroffen, so vollzieht sich die Nachlieferung des „Antikörpers“ symptomlos, wie dies in verschiedenen Fällen bei der immunisatorischen Antikörperproduktion festgestellt wurde (siehe Sahli, loc. cit. S. 38).

³⁾ Sahli, loc. cit. S. 26 und 27.

ringen Mengen, gewissermaßen im Keim, präformiert. Sie spielen im Leben irgend eine unbekannte physiologische Rolle so gut wie die besser, aber in ihrer physiologischen Bedeutung fast ebensowenig bekannten übrigen Blutbestandteile und erlangen ihre schützende Bedeutung erst bei der Einwirkung eines zufällig auf sie passenden Antigens.

2. Die Zahl dieser präformierten Antikörper ist infolge der ungeheuren Mannigfaltigkeit der Kolloide, über welche der Organismus verfügt, praktisch unendlich und deshalb finden so gut wie alle denkbaren Antigene unter ihnen zufällig ihre Partner, mit welchen sie kolloidale Verbindungen eingehen können. Diese Partner können übrigens mehreren Antigenen gemeinsam sein, ebenso wie auch ein Antigen verschiedene Antikörper finden kann. Die Existenz dieser präformierten Antikörper ist, da die meisten derselben gar nicht in die Lage kommen, anders als experimentell eine effektive Antikörperrolle zu spielen, jedenfalls nur in Ausnahmefällen auf phylogenetische Anpassung, meist dagegen bloß auf die praktisch unendliche Mannigfaltigkeit des Kolloidbestandes des Organismus zurückzuführen.

3. Die immunisatorische Anreicherung dieser Substanzen geschieht nach den allgemeinen in der Oekonomie des Organismus geltenden Gesetzen des sekretorischen Ersatzes und Ueberersatzes verbrauchter Substanzen. Der diese Sekretionen auslösende Vorgang liegt in scharfem und prinzipiellem Gegensatz zur Ehrlichschen und auch der ihr verwandten Landsteinerschen Lehre, welche eine direkte Beeinflussung von Zellen durch das Antigen annehmen, bloß in dem Sinken des physiologischen Konzentrationsniveaus der Körperflüssigkeiten an den betreffenden Substanzen, wofür die Zellen im Interesse der Erhaltung der Blut- und Säftezusammensetzung hochempfindlich sind. Auf die geringste humorale Minusschwankung reagieren die Zellen durch Nachsekretion, eventuell durch Uebersekretion des fehlenden. Die Anreicherung der Antikörper findet dabei natürlich von Fall zu Fall in verschiedenem quantitativen Ausmaß statt. Es hängt dies nicht bloß von der Intensität der Antigenwirkung, sondern auch von der Leistungsfähigkeit des Organismus und wahrscheinlich auch von der Bedeutung des betreffenden Antikörpers für die rein physiologischen Funktionen des Organismus ab, da eine physiologisch für den gesunden Organismus wichtige Substanz wohl in höherem Maß die Tendenz hat, sich in reichem Maße zu reproduzieren.“

Aus dem Angeführten geht hervor, daß Sahli als Ursache der

Antikörperbildung Aenderungen in der Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten anspricht. Mit einer solchen Annahme würden aber jene interessanten Immunisierungsvorgänge nicht erfaßt, die im Kampf der Einzelligen untereinander prinzipiell das gleiche Bild bieten, wie es als Folge der wechselseitigen Angriffs- und Verteidigungsmaßnahmen zwischen dem höheren tierischen Organismus und den Bakterien in die Erscheinung tritt. Wie d'Herelle¹⁾ gezeigt hat, ist der Bakteriophage als ein obligater Parasit zahlreicher Bakterien zu betrachten²⁾. Er spielt also gegenüber diesen Bakterien dieselbe Rolle, wie dies viele parasitäre Protistenformen tun, die sich im Innern von Infusorien entwickeln³⁾. Bei der geringen Größe der Bakterien entgehen jedoch ihre Endoparasiten der direkten mikroskopischen Beobachtung. Sie sind ultravisibel und finden sich nach der Filtration einer befallenen Bakterienkultur durch eine Tonkerze⁴⁾ im Filtrat. Ist das betreffende Bakterium pathogen, so ist der Moment der beginnenden Rekonvaleszenz gekennzeichnet durch das Virulentwerden des Bakteriophagen gegenüber diesem Bakterium.

Handelt es sich z. B. um Ruhr, so erhält man einen gegen Shiga- oder Flexner- oder Y-Ruhrbazillen, oder mehr oder weniger ausgeprägt gegen alle drei Ruhrerreger virulenten Bakteriophagen nach d'Herelle⁵⁾ in der Weise, daß man von den Darmanseerungen eines in beginnender Rekonvaleszenz befindlichen Patienten 10 Tropfen in ein Bouillonröhrchen gibt, oder daß man bei weniger flüssigen, weichen oder festen Stühlen 2—5 g in 50 ccm Bouillon sorgfältig zerreibt und nach 12—18stündigem Aufenthalt der Emulsion im Brutschrank von 37° erst durch Infusorienerde und dann durch die Tonkerze filtriert. Für die erstere Filtration wird ein Gemisch von sterilem Wasser mit Infusorienerde auf ein Faltenfilter gegossen, so daß es sich mit einem feinen Ueberzug von Infusorienerde bedeckt. Auf dieses Faltenfilter wird die ganze Emulsion auf einmal aufgeschüttet und das so geklärte Filtrat durch die Tonkerze gegeben. Nun werden

¹⁾ d'Herelle, *Le Bactériophage, son rôle dans l'immunité* (Paris 1921) übersetzt von Dr. Pfreimter, Dr. Selle und Pistorius (Braunschweig 1922), siehe daselbst die ganze einschlägige Literatur von d'Herelle und seinen Mitarbeitern, wie von anderer Seite, 137 Publikationen von 1917—1922.

²⁾ Ueber die Wirkung eines Coccen in eine glasige Masse umwandeln-dem ultrafiltrierbarem Virus der Pockenlymphe siehe Twort, *Lancet* 4. Dez. 1915.

³⁾ Einen solchen Fall hat Adrienne Köhler bei Kolpoden im Laboratorium der Verfasserin eingehend verfolgt; siehe Adrienne Köhler, *Untersuchungen an Kolpoden*, Inaug.-Dissert. d. Universität Bern. Ueber weitere parasitäre Protisten siehe die Literatur in dem Spezialwerk von Bütschli.

⁴⁾ d'Herelle, loc. cit. S. 10 verwendet das Modell von Martin mit Chamberlandkerzen L_2 oder L_3 .

⁵⁾ d'Herelle S. 10 ff.

drei Bouillonröhrchen¹⁾ — oder bei der Prüfung auf die Virulenz gegen verschiedene Bakterien je drei Bouillonröhrchen — mit einer am vorhergehenden Tag angelegten Schrägagarkultur des betreffenden Bazillus beimpft und einem der Bouillonröhrchen 1 Tropfen, einem andern 10 Tropfen und dem dritten 2 ccm des Kerzenfiltrates zugefügt. Dann werden die Bouillonröhrchen, zusammen mit einer Kontrolle mit den Ruhrbazillen allein, 12—18 Stunden in den Brutschrank gestellt. Sind die drei Versuchsröhrchen nach dieser Zeit klar geblieben, während die Kontrolle der Ruhrbazillen allein normales Wachstum zeigt, so ist ein gegen die betreffenden Bazillen stark virulenter Bakteriophage zugegen, von dessen Wirksamkeit man sich in der Weise überzeugt, daß man drei dünne Aufschwemmungen von jungen Agarkulturen in Bouillon herstellt und zu jeder Aufschwemmung einen Tropfen aus einem der klar gebliebenen Versuchsröhrchen setzt und nach dem Durchschütteln jeder Probe eine Oese davon auf Schrägagar ausstreicht. Nach 12—18 stündiger Bebrütung ist in den Bouillonaufschwemmungen nach der Reihenfolge ihres Bakteriophagegehaltes Klärung, d. h. also Lösung der aufgeschwemmten Bakterien eingetreten und die Agarkulturen weisen an denjenigen Stellen, an denen sich Bakteriophagenkolonien auf ihrem lebenden Substrat — den Bakterien der Kultur — entwickelten, runde Löcher auf. Mit der Virulenz des Bakteriophagen gegenüber dem betreffenden Bakterienstamm nimmt die Zahl und der Durchmesser der Löcher zu, der, von Teilen eines Millimeters, bis zu 4—5 mm betragen kann. Zur Steigerung der Virulenz des Bakteriophagen, die namentlich dann erforderlich ist, wenn die mit den Bazillen und mit dem Tonfiltrat wie angegeben versetzten Bouillonröhrchen noch zum Teil (als Folge eines vorhandenen Bakterienwachstums) trüb erscheinen, wird vom Rande der in der Agarkultur aufgetretenen Löcher Material mit der Platinnadel auf ein steriles Agarröhrchen ausgestrichen. Die angehende Kultur zeigt eine starke Vermehrung der Löcher, nach nochmaliger Wiederholung der Prozedur ein Ueberwiegen der letzteren und nach weiteren Passagen schließlich nur mehr einige verstreute Bakterienkolonien, während der übrige Agar steril geblieben ist. Man schwemmt nun die Röhrchen mit Bouillon ab und unterwirft die Abschwemmung der Filtration durch Infusorienerde und Tonkerze²⁾. Solche Filtrate stellen eine unsichtbare Bakteriophagen-

¹⁾ Die Bouillon muß alkalisch sein; d. h. es müssen der neutralisierten Laboratoriumsbouillon pro Liter 6 ccm Normalsodalösung zugesetzt werden, da der Bakteriophage sehr säureempfindlich ist. Es wirft dies wiederum ein Licht auf die Tatsache, daß bei einer Anzahl Infektionskrankheiten in der Rekonvaleszenz eine Zunahme der potentiellen Alkaleszenz des Blutes, bei Patienten, welche der Infektion erliegen, dagegen umgekehrt eine Abnahme der Alkaleszenz bzw. eine Zunahme der potentiellen Azidität zu konstatieren ist. Siehe ferner das Auftreten von eosinophilen Leukozyten bei beginnender Rekonvaleszenz nach schweren Infektionskrankheiten, wie Meningitis cerebrospinalis.

²⁾ Auch wenn die angegebene Virulenzsteigerung nicht notwendig ist, d. h. also in denjenigen Fällen, wo vollkommene Klärung aller drei mit Bakterien und dem erstgenannten Kerzenfiltrat angesetzten Bouillonröhrchen eintritt, muß das erhaltene Lysat der Tonkerzenfiltration unterworfen werden, um ein nachträgliches Auskeimen von sog. Sekundärkulturen aus resistenten Bakterienformen (Kapselform oder Granulaform, s. z. B. die Granulaform der Tuberkelbazillen) zu verhindern.

tur dar, die, per os oder subkutan gegeben, einen weitgehenden Schutz gegen homologe Bakterien in denjenigen Fällen zu bieten vermag, wo kein Bakteriophage vorhanden ist, oder wo derselbe nicht in nützlicher Frist virulent gegenüber dem fraglichen Bakterium zu werden vermag. So konnten d'Herelle und Iere¹⁾ schwere Fälle von Dysenterie, Typhus, Paratyphus, Pyelozystitis (Colibakterien) und Furunkulose (Staphylococci) 24—28 Stunden nach Verabreichung von 0,5 ccm der unschädlichen virulenten Bakteriophagenkulturen per os oder subkutan²⁾ in Heilung übergehen sehen und für Cholera und Pest die Wirksamkeit auf Grund des spärlichen Materials wenigstens wahrscheinlich machen. Auch hat Iere³⁾ ein Gonococcenvaccin auf dieser Basis hergestellt. Bei den untersten verheerenden Tierseuchen, wie der Typhose des Geflügels und der Barbarnie (Büffelseuche) waren die Immunisierungsversuche von glänzendem Erfolg begleitet, wobei jedoch im letztern Fall eine durch die von den Bakteriophagen gelöste Substanz der Bakterienleiber, bzw. ein Toxin oder Endotoxin der Barbarnie-Bakterien, ausgebildete antitoxische Immunität die entscheidende Rolle spielt.

Das wirksame, durch Ausfällen des Bakteriophagen mit der 10fachen Menge 95%igem Alkohol, von diesem abtrennbare Prinzip, durch welches der Bakteriophage das befallene Bakterium zu überwinden vermag, ist ein lytisches Ferment. Es wird dies direkt bewiesen und zwar makroskopisch wie mikroskopisch. Im ersteren Fall liegt der Beweis in der völligen Klärung trüber Bakterienbouillonkulturen in Gegenwart von gegen diese Bakterien, sei es in vivo oder in vitro (durch den Passageversuch), virulent gewordenen Bakteriophagen, sowie in dem Ausbleiben des Bakterienwachstums an denjenigen Stellen des Nähragars, die den von dem Virus befallenen Teilen des Bakterienrasens entsprechen. Daß es sich nicht um unreformte Fermente allein, z. B. aus den zugrunde gegangenen Bakterien selber handelt (autolytische Fermente), wie dies vielfach angenommen wird³⁾, sondern um ein Lebewesen, läßt sich z. B. daraus schließen, daß sich aus den Löchern im Bakterienrasen das Virus weiterzüchten läßt. Auf mikroskopischem Wege erfolgt der Nachweis der Lyse in der Weise⁴⁾, daß man die der Lyse zu unterwerfende Bactillenemulsion mit 0,1 ccm der Bakteriophagenkultur in den Brutschrank von 37° stellt und von 15 zu 15 Minuten je einen auf einen Objektträger aufgestrichenen Tropfen des Gemisches mikroskopisch untersucht. Bei Shigabazillen ist die Zahl und Form nach 1/2 Stunde noch unverändert, aber die Färbbarkeit ist bei einem Teil derselben stark herabgesetzt. In der Folge vermehrt sich die Zahl der schwach färb-

¹⁾ S. d'Herelle, loc. cit. S. 197.

²⁾ Bei der subkutanen Einverleibung genügt eine geringere Menge.

³⁾ Siehe z. B. Bail, Otto und Winkler, Weinberg und Aznar u. a.

⁴⁾ Siehe d'Herelle loc. cit. S. 39—42.

baren Stäbchen mehr und mehr, während gleichzeitig amorphe Massen und schwerer lösliche Körnchen als Trümmersmaterial zerstörter Bakterienzellen, sowie kugelige und elliptische Bakterienformen auftreten. Bei der ultramikroskopischen Untersuchung erscheinen die letzteren als offenbar durch die (von den Lysinen des endoparasitären Bakteriophagen aus der Bakteriensubstanz gebildeten) Spaltprodukte gedehnte und nach dem Zerreißen ihrer Membran zersplitterte Bakterien. Dabei werden zugleich die ultramikroskopisch im Bakterieninnern feststellbaren Granula frei, die d'Herelle als durch Zerfall des Bakteriophagen entstandene keimfähige Bakteriophageanteile betrachtet.

Diese Auffassung über den endoparasitären Charakter des Bakteriophagen, seine Vermehrung im Bakterieninnern und das Freiwerden der keimfähigen Zerfallprodukte, wird auch durch das von d'Herelle¹⁾ bei Shigabazillen nach $\frac{1}{2}$ stündigem Kontakt mit demselben durch Kulturversuche und Zählung festgestellte Verschwinden des Bakteriophagen aus der Bouillon und das nach 90 Minuten beobachtete Wiederauftreten desselben in zirka 18 fach größerer Menge gestützt.

Was den indirekten Nachweis der Lyse betrifft, so läßt sich derselbe, wie dies in einem früheren Kapitel näher ausgeführt wurde, nach verschiedenen Methoden führen:

Für die Bakteriophagenlysine gelingt der indirekte Nachweis ihrer Wirkung durch die Opsoninmethode, bei welcher sich die erste Phase des lytischen Effekts, die Andauung der Bakterien, in der Begünstigung ihrer Aufnahme durch die Leukozyten verrät. Entsprechend ihrer sehr starken Aktivität ist auch die opsonische Wirkung der Bakteriophagenlysine gegenüber den Bakterien, auf welche sich der Bakteriophage auf natürlichem Wege oder durch künstliche Gewöhnung — durch wiederholte Passagen in der beschriebenen Weise — eingestellt hat, eine außerordentlich große. Daher werden bei der Bestimmung des opsonischen Index nach Wright und Douglas, (durch Zusammenbringen der Leukozytenaufschwemmung einerseits mit der betreffenden Bakterienemulsion und Bouillon allein, anderseits mit der Bakterienemulsion und der unverdünnten Bakteriophagenbouillonkultur), opsonische Indizes von 40 und mehr erhalten. Die Auszählung der von den Leukozyten aufgenommenen Keime erfordert aus diesem Grunde das Arbeiten mit 250fachen Verdünnungen.

Gegen die Wirkung der Bakteriophagenlysine vermögen aber die betreffenden Bakterien ihrerseits immun zu werden. Sie zeigen dann die Phänomene der Lyse und Opsonierung nicht. Auch sind sie in-

¹⁾ d'Herelle loc. cit. S. 36—39.

agglutinabel. Dem Lysin setzen sie ein Antilysin entgegen, das zu dem ersteren in derselben Beziehung steht, wie das vom höheren Organismus gegen ein eindringendes Bakterientoxin ins Feld gesetzte Antitoxin. Es handelt sich offenbar hier um Aenderungen an der Bakterienmembran, die als eine Folge des lytischen Angriffs des anstürmenden Bakteriophagen selbst zu betrachten sind. In ganz ähnlicher Weise, wie wir dies für die Ausbildung der Resistenz gegen die eigenen Fermente bei den Schleimhäuten, die den Verdauungstraktus auskleiden, angenommen haben, kommt es zu einer oberflächlichen Mazeration. Die Verdauungsprodukte der eigenen Substanz häufen sich an und führen zu einer selbsttätigen Hemmung der weiteren Verdauung, ja sogar zu der Ausbildung einer membranösen plasteinartigen Schutzschicht durch resynthetische Prozesse. Das morphologische Bild zahlreicher resistenter Bakterien spiegelt direkt diesen Modus der Bakterienimmunität wieder. Abgesehen von der ebenfalls resistenten granulären Modifikation finden wir diese Bakterien von einer schleimartigen Kapsel umgeben (Zoogloebildung), die sehr wohl durch eine Veränderung der Membran selbst entstanden sein kann. In diesen Fällen des gegenseitigen Angriffs- und Verteidigungskrieges zwischen Zelle und Zelle kann die Ausbildung der Immunität ebenfalls nur zellulären Ursprung besitzen. Ich möchte daher auch beim höheren Tier, das, wie gesagt, in allen Punkten die nämlichen Merkmale der Immunität zeigt und die gerade in der histogenen Immunität¹⁾ direkt auf einen zellulären Ursprung der Antikörper hinweist, dem Blut als Träger der Antikörper nur sekundäre Bedeutung zuschreiben.

Die Amidasen.

Es mögen nun noch einige Fermente Erwähnung finden, welche Oppenheimer²⁾ den Proteasen vorangestellt hat. Wie unter diesen von den Peptasen die spezifische Polypeptidbindung — CO—NH — durch Uebertragung der Elemente des Wassers gelöst und Karboxyl- und Aminogruppe in Freiheit gesetzt werden, so auch von den Amidasen gegenüber den einfachsten Repräsentanten der ganzen, durch analoge Bindungsweise ausgezeichneten Körperklasse. Es handelt sich also bei den Amidasen um hydrolysierende Enzyme, in deren Gegenwart Amine

¹⁾ Wassermann u. Citron, Zeitschr. f. Hygiene Bd. 50; Bloch u. Massini, Ebenda 63 (1909); Dale, Journ. of Pharmacol 4 (1913) Nr. 3; Fellner, Wiener klin. Wochenschr. (1919) S. 936; Römer, Arch. f. Ophtal. Bd. 52 (1901).

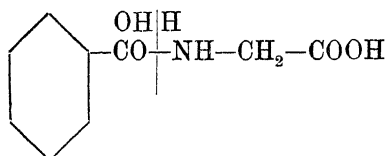
²⁾ Oppenheimer, Fermente, 4. Aufl., Bd. 1, Leipzig 1913, S. 354 ff.

und Amide die Elemente des Wassers aufnehmen, — ein Prozeß, der mit der Abspaltung von Ammoniak oder Ammoniakabkömmlingen sein Ende erreichen kann.

Die wirksamen Enzyme werden von Schimmelpilzen, Fäulnisbakterien, Hefen und anderen Mikroorganismen, von Keimpflanzen wie auch innerhalb der Organe höherer Tiere produziert ¹⁾.

Nach der Art des Substrates und der weitgehenderen oder weniger weitgehenden Hydrolyse, die sie bedingen, kann man verschiedene Typen unterscheiden.

Histozym und Urease. Die Säureamide werden unter Aufnahme von Wasser in die Ammoniumsalze der betreffenden Säuren übergeführt. Es geht die feste organische Bindung der Amidogruppe in die lockere anorganische Ammoniumsalzbindung über, was einer Desamidierung gleichkommt, oder es entsteht direkt freie Säure neben Ammoniak oder einer aminartigen Verbindung. Diese zu einem bei 97% Spaltung liegenden Gleichgewicht ²⁾ führende Umwandlung, der demnach eine resynthetisierende gegenübersteht ³⁾, vollzieht sich unter dem Einfluß des von Schmiedeberg ⁴⁾ als Histozym bezeichneten Organferments. Als dessen typische zu seinem Nachweis dienende Reaktion ist die Umwandlung der in Ligroin schwer löslichen Hippursäure



in die in Ligroin leicht lösliche Benzoesäure (Kristallplättchen vom Schmelzpunkt 121°) und Glykokoll zu betrachten.

Es werden 0,5 g Hippursäure zu dem mit einigen Tropfen schwacher Sodalösung angesetzten, auf Histozym zu prüfenden Organpreßsaft oder wäßrigen Extrakt gefügt, Toluol zugesetzt, das Gemisch 5—10 Tage im Brutschrank sich selbst überlassen und hierauf mehrmals mit Ligroin die Benzoesäure extrahiert, die beim Verdunsten der vereinigten Ligroinfraaktionen auskristallisiert.

Eine analoge Hydrolyse vollzieht sich in Gegenwart der Urease, dem von einer Reihe, die ammonikalische Harngärung verursachenden

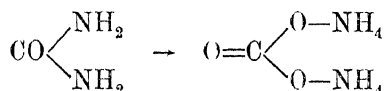
¹⁾ Siehe darüber Oppenheimer, vorige Fußnote, S. 354 ff.

²⁾ Mutch, Journ. Physiol. 44 (1912) 176.

³⁾ Mutch, loc. cit. vorige Fußnote; siehe schon Abelous u. Ribaut, Compt. rend. Soc. Biol. 52 (1900) 543, welche unter dem Einfluß von Nierenextrakt, nach offenbar vorausgegangener Oxydation, aus Benzylalkohol und Glykokoll Hippursäure erhielten.

⁴⁾ Schmiedeberg, Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 14 (1881) 288, 379.

Bakterien¹⁾ sowie Schimmelpilzen und Organen höherer Pflanzen (insbesondere Papillionaceen) abgesonderten Enzym der Harnstoffgärung, welches die Umwandlung des Harnstoffs in kohlensaures Ammon:



resp. CO_2 und $2\text{NH}_3 + 3\text{H}_2\text{O}$ ²⁾ bedingt.

Die weite Verbreitung der Urease muß bei der Beurteilung negativer Resultate beim Suchen nach Harnstoff und Stoffen, wie namentlich dem Arginin, welche bei der Spaltung Harnstoff ergeben, berücksichtigt werden. So können bei Weizenkeimen 91 % des Harnstoffs nach Kiesel³⁾ durch die Urease eliminiert worden sein. Der auf anderem Wege sehr schwer zu erzielende glatte Verlauf der hydrolytischen Spaltung des Harnstoffs, bzw. nach Armstrong⁴⁾ des Harnstoffhydrats, war sogar die Veranlassung dafür, daß Geza Zemplén⁵⁾ die Urease der Robiniansamen, welche in frischem Zustand gemahlen werden, zur technischen Gewinnung von kohlensaurem Ammon aus Harnstoff anzuwenden versuchte.

Musculus⁶⁾ hat sich derselben fermentativen Umwandlung bedient, um Harnstoff in einer Flüssigkeit nachzuweisen. Zu dem Zweck bereitet er sich ein Urease führendes Reagenzpapier, indem er mit Alkohol versetzten ammoniakalischen Cystitisharn, in dessen Bodensatz sich das Ferment nach Lea⁷⁾ an die Bakterien⁸⁾ gebunden findet, durch Papierfilter gibt, dieselben mit Aether auswäscht, bei 35 bis 40° trocknen läßt, mit Kurkuma färbt, wiederum trocknet und dann in gut verschlossenen Gefäßen aufbewahrt. Der Harnstoffnachweis

¹⁾ Am wirksamsten unter diesen Bakterien ist der *Urobacillus Pasteuri* (siehe Kruse, Mikrobiologie. 1911, S. 595).

²⁾ Siehe schon Boerhave, *Elementa chimiae* 2, London 1732; Fourcroy u. Vauquelin, *Ann. Chim. anal. appl.* 31, 48, 32, 80, 113.

³⁾ Kiesel, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 75 (1911) 169.

⁴⁾ H. E. Armstrong u. E. Horton, *Proc. Royal Soc. London* [Ser. B] 85 (1912) 109.

⁵⁾ Geza Zemplén, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 79 (1912) 229; *Zeitschr. f. angew. Chem.* 25 (1912) 1560.

⁶⁾ Musculus, *Ber. d. chem. Ges.* 7 (1874) 124, 9 (1876) 357; *Pflügers Archiv* 12 (1874) 214; *Compt. rend.* 78 (1874) 132; siehe ferner die Bestätigung der Angaben von Musculus über das Harnferment: Pasteur u. Joubert, *Compt. rend.* 83 (1876) 5; *Ber. d. chem. Ges.* 9 (1876) 1130.

⁷⁾ Lea, *Journ. Physiol.* 6 (1885) 136.

⁸⁾ Siehe ferner Leube u. Beyerinck, *Zentralbl. f. Bakteriologie* [2] 7 (1901) 33.

erfolgt dann durch einfaches Eintauchen des Harnfermentpapiers in die neutrale Untersuchungsflüssigkeit. Ist Harnstoff zugegen, so gibt sich derselbe durch die nach einiger Zeit auftretende, durch die Bildung von Ammoniumkarbonat verursachte Bräunung des Fermentpapiers zu erkennen. Wirksame Ureasepräparate können nach Moll¹⁾ auch durch Alkoholfällung aus *Micrococcus ureae* gewonnen werden. Außerdem ist der sehr verbreitete Schimmelpilz *Aspergillus niger* ein geeignetes Objekt für die Gewinnung der Urease in wirksamer und haltbarer Form. Shibata²⁾ kultiviert den Pilz während 3—5 Wochen auf einer Nährlösung, die 1—3 % Pepton, 0,5—3 % Zucker und 0,2 % Nährsalz enthält. Aus den von der Kulturflüssigkeit abgehobenen, auf ein feines Sieb verbrachten Myzelien werden die Konidien und anhaftende Kulturflüssigkeit durch einen starken Wasserstoffstrom entfernt, die Masse abgepreßt, zu Pulver zerrieben, 15 Minuten mit Azeton (das einmal erneuert wird) entwässert, zwischen Filtrierpapier wieder abgepreßt und mit Äther mehrmals nachgewaschen. Das Präparat wird dann zu einem sehr feinen Pulver zerrieben und ist nach 12 bis 14stündigem Verweilen im Thermostaten gebrauchsfertig.

Bei 80° wird die Urease wie so viele Fermente zerstört. Doch schon die im übrigen für die Amidasewirkung optimale Temperatur von 50° wirkt so stark schädigend auf das Ferment, daß dasselbe in wenig Stunden zugrunde geht. Harnstoff, wie Methylharnstoff sowie die Umwandlungsprodukte Ammoniak und Ammoniumkarbonat wirken hemmend, während Kohlensäure aktiviert. Hierdurch müssen sich für den Verlauf der Ureasewirkung, durch die Uebereinanderlagerung positiv und negativ autokatalytischer Einflüsse höchst merkwürdige Gesetzmäßigkeiten ergeben, die für die Harnstoffbestimmung wie für die Ureaseermittlung³⁾ nicht bedeutungslos sein dürften.

Die letztere erfolgt in der Weise, daß das auf Urease zu untersuchende Material auf 50—100 ccm 1%ige Harnstofflösung unter Toluolzusatz während einigen Tagen bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank zur Einwirkung kommt. Nach dieser Zeit wird am filtrierten Reaktionsgemisch wie an einer gleich behandelten Kontrolle, die statt Harnstofflösung Wasser enthält, das gebildete Ammoniak nach Schlösing oder nach einer anderen Methode⁴⁾ bestimmt.

¹⁾ Moll, Hofmeisters Beitr. 2 (1902) 344.

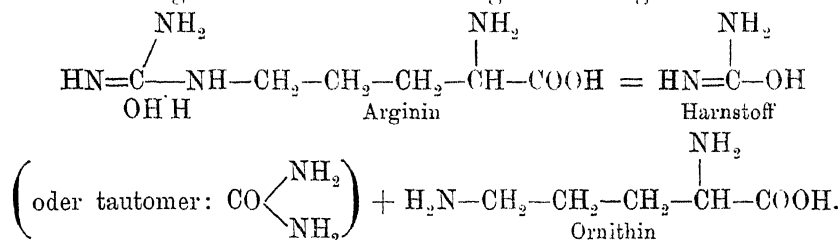
²⁾ Shibata, Hofmeisters Beitr. 5 (1904) 384.

³⁾ Siehe Wohlgemuth, Grundriß der Fermentmethoden, Berlin 1913, S. 257, 258.

⁴⁾ Siehe hierüber Sahli, Lehrbuch der klin. Untersuchungsmethoden 2 (1914) 142—145, sowie die Originalliteratur: M. Krüger u. O. Reich, Zeitschr. f. physiol.

Zu 25 ccm des Filtrats wird die gleiche Menge Kalkmilch (1 Gewichtsteil Kalkhydrat zu 12 Gewichtsteilen Wasser) gefügt, über die dieses Gemisch enthaltende Schale sofort ein mit 10 ccm normaler Schwefelsäure beschicktes Schälchen mittels eines Glasdreiecks angebracht und beide Schälchen im luftdicht schließenden Schlösingschen Apparat während 3—4 Tagen bei 10—15° C. sich selbst überlassen. Durch Titration mit $\frac{1}{4}$ -Normalnatronlauge wird hierauf die nicht durch Ammoniak mit Beschlag belegte Schwefelsäure ermittelt, unter Verwendung von Methylorange als Indikator. Die gefundene Kubikzentimeterzahl, von 40 ccm subtrahiert, entspricht also der an Ammoniak gebundenen Schwefelsäure und ergibt somit die Ammoniakmenge durch Multiplikation der Kubikzentimeterzahl (der Differenz) mit $\frac{17}{4}$. Ist nur wenig Ammoniak zu erwarten, so empfiehlt es sich, das Absorptionsschälchen mit $n/10$ -Schwefelsäure zu beschicken und mit $n/10$ -Natronlauge zurückzutitrieren unter Verwendung von Lackmold-Malachitgrün (10 g Lackmold in 150 ccm Alkohol gelöst, filtriert und mit 50 ccm Alkohol, welcher 1 g Malachitgrün enthält, vermischt), eine Indikatorkombination, die Salaskin u. Zaleski¹⁾ zu solchen Zwecken empfohlen haben. Die von der Gesamtschwefelsäuremenge in Abzug gebrachte, bei der Titration ermittelte Kubikzentimeterzahl ergibt, mit 1,7034 multipliziert, die durch die Kalkmilch aus dem (unter dem Ureaseeinfluß entstandenen) Ammoniumkarbonat in Freiheit gesetzte Ammoniakmenge in Milligramm.

Die Arginase. In anderer Weise vollzieht sich die Hydrolyse des d-Arginins²⁾, welches unter dem Einfluß der in tierischen und pflanzlichen Organen verbreiteten³⁾, von Kossel und Dakin⁴⁾ aufgefundenen Arginase in Ornithin und Harnstoff zerfällt, welcher letzterer zum großen Teil auf diesem Wege in den Organismen entsteht:



Chem. 39 (1903) 165; Schittenhelm, Ebenda 39 (1903) 73; Folin, Ebenda 37 (1902/03) 161; Moritz, Archiv f. klin. Medizin 83 (1905); Wital, Ueber klin. Ammoniakbestimmung, Inaug.-Dissert. der Klinik Sahli (Universität Bern 1913).

¹⁾ Salaskin und Zaleski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28 (1899) 76.

²⁾ Da l-Arginin nicht angegriffen wird, so bleibt dasselbe bei der Spaltung des razemischen Arginins mittels Arginase zurück, wie Rießer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 49 (1906) 210, gefunden hat.

³⁾ Siehe über die Verbreitung der Arginase Shiga, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42 (1904) 502; Kiesel, Ebenda 60 (1909) 460; Mihara, Ebenda 75 (1911) 443; siehe auch schon Richet, Compt. rend. Soc. Biol. 46 (1894) 525; Compt. rend. 118, 1127.

⁴⁾ Kossel u. Dakin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41 (1904) 321, 42 (1904) 181; Dakin, Journ. Biol. Chem. 3 (1907) 435.

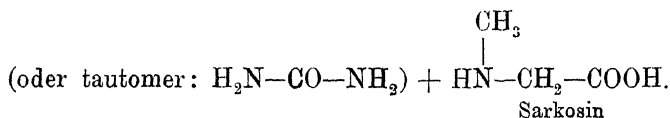
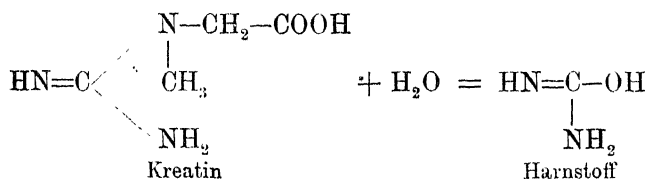
Die Darstellung eines stark wirksamen, haltbaren Arginasepräparates erfolgt durch Auspressen der in der Fleischhackmaschine fein zerkleinerten und mit Kieselgur zerriebenen Leber eines entbluteten Hundes, Ausfällen des Preßsaftes mit Alkohol (2 Teile) — Aether (1 Teil), Abfiltrieren und Trocknen des Niederschlags über Schwefelsäure im Exsikkator. Auch mittels der 4fachen Menge 0,2%iger Essigsäure läßt sich die fein zerkleinerte Leber extrahieren. Das nach 12stündiger Digestion im Brutschrank gewonnene Filtrat kann dann mit Ammonsulfat (bei nachheriger Befreiung des Niederschlags vom Fällungsmittel durch Dialyse) oder mit Aetheralkohol gefällt werden.

Die Ermittlung der Arginase erfolgt durch mehrtägiges Digerieren einer 1—2 g Arginin bzw. Argininkarbonat enthaltenden Lösung mit 50 ccm einer Aufschwemmung von 0,5—1 g des auf Arginase zu prüfenden Organpulvers oder 20 ccm frischem Organpreßsaft, oder 25 g Organbrei im Brutschrank unter Zusatz von Toluol. Das danach erhaltene Filtrat wird bei Organpulver direkt mit Phosphorwolframsäure gefällt und im Filtrat der Stickstoff bestimmt, der dem gebildeten Harnstoff entspricht. Das unveränderte Arginin ergibt sich aus dem phosphorwolframsauren Niederschlag durch Zerlegen desselben mit Baryt, Filtration, Ansäuern des Filtrates mit Schwefelsäure, Ausfällen mit Silbersulfat und Aetzbaryt und Bestimmung des dem Arginin entsprechenden Stickstoffgehaltes des erhaltenen Niederschlags. Aus dem Stickstoffgehalt des Filtrates erhält man dagegen die Menge des gebildeten Ornithins.

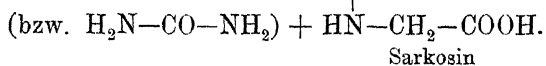
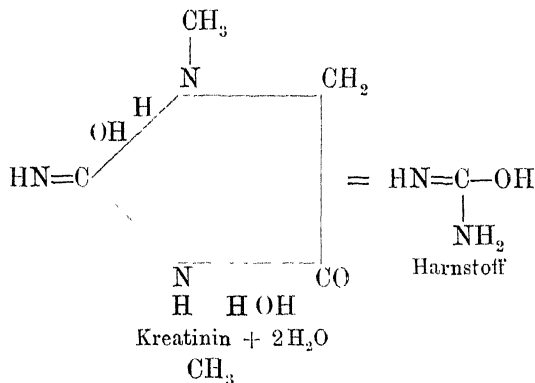
Bei Organbrei oder Preßsaft wird nach der Digestion zunächst das Eiweiß durch Aufkochen koaguliert, vom Niederschlag abfiltriert, mit heißem Wasser nachgewaschen, das Filtrat auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und in einem abgemessenen Teil desselben der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt, während der übrige — größere Teil — mit Phosphorwolframsäure gefällt und gleich wie bei der Verwendung von Organpulver weiter verarbeitet wird. In derselben Weise wird die gleiche Organmenge ohne Argininzusatz behandelt und die erhaltenen Werte für Harnstoff, Arginin und Ornithin von den entsprechenden beim Hauptversuch gewonnenen subtrahiert.

Kreatase und Kreatinase. Möglicherweise entspricht die an Preßsäften (der mit Kieselgur oder Quarzsand nach Buchners Methode zerriebenen Organe)¹⁾ beobachtete, durch Kreatase bedingte Spaltung des Kreatins ebenfalls dem nämlichen Modus, welcher mit der Umwandlung des Guanidinrestes in Harnstoff verknüpft ist:

¹⁾ Nach Gottlieb u. Stangassinger (loc. cit.) können die so zerriebenen Organe (Leber, Muskeln, Schilddrüse, Niere, Milz, Lunge) auch der Extraktion mit physiologischer Kochsalzlösung während einer halben Stunde unter Umrühren unterworfen und das Extrakt durch Zentrifugieren von den festen Bestandteilen getrennt werden.



Die Umwandlung des Kreatinins durch die Kreatinase könnte demgegenüber als eine Kombination der beiden ersten Spaltungstypen betrachtet werden, entsprechend den beiden verschiedenartigen, durch Hydrolyse lösbaren Bindungen in dem den Ureiden an die Seite zu stellenden Guanideidmolekül:



Da bei der Autolyse der Muskeln bei einem Teil des Kreatins eine Anhydrierung zu Kreatinin¹⁾ beobachtet wird, so dürfte sich in diesem Prozeß, dessen fermentative Natur übrigens Oppenheimer²⁾ in Zweifel zieht, die rückläufige synthetische Wirkung einer Amidase dokumentieren.

Die Ermittlung der erwähnten Fermente erfolgt nach Gottlieb und Stangassinger (loc. cit.) durch Eingießen der während 3 bis

¹⁾ Siehe nähere Angaben und Literatur über die genannten Fermente in Oppenheimer, Fermente, Bd. 1, Leipzig 1913, S. 366; Nicola, Giorn. Reale Accad. di medicina di Torino 68 (1905) Heft 5/6; Biochem. Zentralbl. 4, 2104; Gottlieb u. Stangassinger, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52 (1907) 1, 55 (1908) 295, 322.

²⁾ Oppenheimer, loc. cit. vorige Fußnote.

6 Tagen im Brutschrank bei 37° sich selbst überlassenen Mischung von 0,05—0,1 g Kreatin oder Kreatinin und 20—50 g Organpreßsaft oder Extrakt in 150 ccm — oder bei Kreatinin in 300 ccm — 5%ige kochende Kochsalzlösung und ganz schwaches Ansäuern mit verdünnter Essigsäure. Dann wird nochmals aufgekocht ¹⁾, das abgeschiedene Eiweiß abfiltriert, mit siedendem Wasser nachgewaschen, das Filtrat zu einem bestimmten Volumen aufgefüllt und in der einen Hälfte desselben das Kreatinin nach Jaffé ²⁾ mittels der (auf Reduktion zu Pikraminsäure beruhenden) Rotfärbung mit Pikrinsäure und Alkali ³⁾, in der anderen Hälfte die Gesamtmenge an Kreatinin und Kreatin bestimmt. Diese Bestimmung läuft auf eine Ueberführung des vorhandenen Kreatins in Kreatinin hinaus, welches letzteres dann nach Folin ⁴⁾ bestimmt wird. Die Umwandlung geschieht durch 3ständiges Kochen (auf dem stark siedenden Wasserbad) der eingeeengten und dann mit verdünnter Salzsäure auf 100 ccm und 2,3 % HCl-Gehalt gebrachten Lösung, Eindampfen zur Trockne und Lösen in 10—20 ccm Wasser. Dann werden 15 ccm einer 1,2%igen Pikrinsäurelösung und 5 ccm 10%ige Natronlauge hinzugefügt und die Mischung nach 5—10 Minuten, wenn die maximale Farbenintensität erreicht ist, auf 500 ccm gebracht. Nach gutem Durchschütteln wird die Lösung in das eine Rohr eines Dubosq'schen Kolorimeters oder eines einfacheren von Gottlieb und Stangassinger (loc. cit.) zu diesem Zweck benutzten Kolorimeters (konstruiert von Runne in Rohrbach bei Heidelberg) gebracht, während das andere Rohr zuvor mit der als Vergleichsflüssigkeit dienenden, auf 8 mm Schichtdicke eingestellten Normalkaliumdichromatlösung beschickt worden ist. Man stellt nun die Schichthöhe fest, in welcher die Untersuchungsflüssigkeit gleich gefärbt ist wie diese Dichromatlösung. Dieser Farbenton entspricht einem Krea-

¹⁾ Nach Mellanby, Journ. Physiol. 36 (1908) 447 u. Rothmann, Zeitschrift f. physiol. Chem. 57 (1908) 131, empfiehlt es sich, das Eiweiß durch Alkohol, statt durch Hitzeokoagulation (bei welchem Eingriff auch Kreatin in Kreatinin umgewandelt werden kann) zu eliminieren und das Filtrat bei höchstens 37° einzudampfen, wobei nochmals 75%iger Alkohol zugesetzt wird.

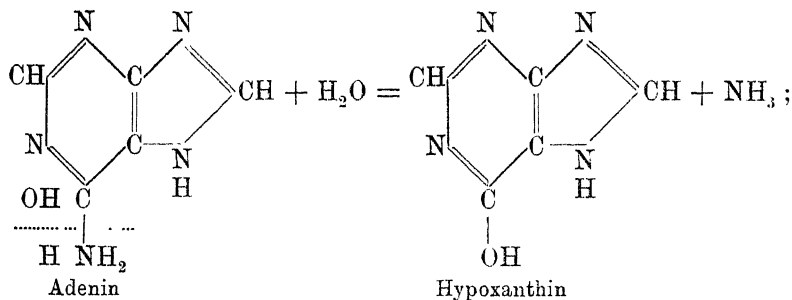
²⁾ Jaffé, Zeitschr. f. physiol. Chem. 10 (1886) 399; Folin, loc. cit. nächstfolgende Fußnote.

³⁾ Zu dem Zweck wird der für die Kreatininbestimmung reservierte Anteil des Filtrates zuvor auf dem Wasserbad (nach Neutralisation der Essigsäure durch Bariumkarbonat) zur Trockne verdampft. Die Kreatininbestimmung kann nach Folin's Methode, wie im folgenden angegeben, erfolgen.

⁴⁾ Folin, Journ. of insanity (1905); siehe auch über die Methode von Folin: Skutetz, Archiv f. klin. Medizin 103 (1911).

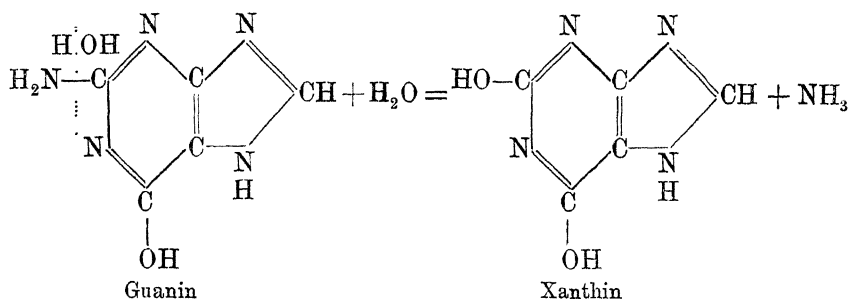
tingehalt von 0,01 in 500 ccm. Aus den Flüssigkeitshöhen in den beiden Röhren des Kolorimeters berechnet sich dann der Kreatininhalt nach den gewöhnlichen kolorimetrischen Prinzipien. Doch ist zu berücksichtigen, daß man nach Gottlieb und Stangassinger (loc. cit.) nur dann genaue Resultate erhält, wenn die Schichthöhe in dem Röhrchen, welches die auf ihren Kreatininhalt zu prüfende Flüssigkeit enthält, nicht mehr als 14 und nicht weniger als 4,2 mm beträgt. Man muß daher gegebenenfalls die Konzentration der zu untersuchenden Lösung so variieren, daß die Ablesung innerhalb der angegebenen Grenzen stattfinden kann. Natürlich könnte für die Bestimmung des vorgebildeten wie des durch Umwandlung von Kreatin gewonnenen Kreatinins auch eine andere Methode, wie die auf der Wägung des aus der Lösung ausgefallten Kreatininchlorzinks nach Neubauer¹⁾ beruhende, ins Auge gefaßt werden, insbesondere dann, wenn sich bei der Säureumwandlung des Kreatins dunkle, ohne Verlust an Kreatinin schwer zu entfernende Produkte bilden, welche die kolorimetrische Bestimmung stören²⁾.

Guanase, Adenase und andere Purinamidasen. Wiederum einem anderen Hydrolysetypus als den bisher erörterten entspricht die Funktion der Guanase und der Adenase, von deren Anwesenheit die Desamidierung des Guanins zu Xanthin und des Adenins zu Hypoxanthin abhängig ist. Die Anlagerung der elektrolytischen Elemente des Wassers OH' und H' zieht hier einfach die Abspaltung von NH₃ nach sich, indem H' an die Aminogruppe, OH' an den Purinkern tritt.



¹⁾ Neubauer, Ann. d. Chem. u. Pharm. 119 (1861) 33; siehe die Modifikation dieser Methode von Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 10 (1886) 113; vgl. auch Späth, Die chem. u. mikroskop. Untersuch. d. Harnes, 1903, sowie das Lehrbuch der Harnanalyse von Neubauer und Vogel.

²⁾ Siehe Dreibholz, Zur Frage der Kreatininausscheidung im Harn, Inaug.-Dissert., Greifswald 1908.



Zur Prüfung auf Adenase oder Guanase¹⁾ wird das in Frage kommende frische Organ²⁾ (Leber, Milz, Lunge sowie pflanzliche Objekte)³⁾ in der gewöhnlichen Weise in der Fleischhackmaschine zerkleinert, mit Kieselgur oder Quarzsand in der Reibschale zerrieben, mit der doppelten bis dreifachen Wassermenge nach Zusatz von Chloroform sorgfältig verrührt, geschüttelt und dann sich selbst während einigen Stunden überlassen. Hierauf wird die Flüssigkeit abdekantiert, koliert und durch aufgeschwemmtes Filtrierpapier filtriert. 500 ccm des Filtrates [oder statt dessen gelöstes, entweder nach Kossel (durch Behandlung mit flüssiger Luft), oder nach Wiechowskis Methode⁴⁾ oder einem verwandten Verfahren⁵⁾ dargestelltes Organpulver] werden dann mit $\frac{1}{2}$ g Adeninsulfat bzw. Guanin⁶⁾ versetzt und verbleiben nach Zugabe von Chloroform und Toluol 5—10 Tage im

¹⁾ Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 43 (1904) 228. 45 (1905) 121; siehe ferner Derselbe. Ebenda 45 (1905) 152. 46, 354, 50, 29, 57 (1908) 21, 63 (1909) 222, 248, 289; Schittenhelm u. Schmid, Zeitschr. f. experim. Pathol. 4 (1907) 424, 432; Künzel u. Schittenhelm, Zentralbl. f. Physiol. d. Stoffwechsels (1908) 721; Schittenhelm, Nukleinstoffwechsel in Oppenheims Handb. d. Biochem. 4 (1911) 1; Jones u. Winternitz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44 (1905) 1, 60 (1909) 180; siehe ferner Jones u. Partridge. Ebenda 42 (1904) 343; Jones. Ebenda 45 (1905) 85; Jones u. Austrian, Ebenda 48 (1906) 110; Journ. Biol. Chem. 3 (1907) 227; Amberg u. Jones, Zeitschr. f. physiol. Chem. 73 (1911) 407; Mendel u. Mitchell, Amer. Journ. Physiol. 20 (1907) 97; Mendel u. Wells, Ebenda 24 (1909) 170; Fränznick, Ueber die Verteilung der Fermente des Purinstoffwechsels in den Organen des Hundes, Inaug.-Dissert., Erlangen 1912.

²⁾ Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42 (1904) 229, 254.

³⁾ Ueber Guanase in Hefe siehe Straughn u. Jones, Journ. Biol. Chem. 6 (1909) 245; in Lupinenkeimlingen Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63 (1909) 289.

⁴⁾ Wiechowski, Hofmeisters Beitr. 9 (1907) 232.

⁵⁾ Siehe über die Darstellung fester, absolut blutfreier Organpulver z. B. Hirsch, loc. cit. im vorigen (Abschnitt über die Abwehrfermente).

⁶⁾ Reines Guanin nach dem Lösen in ganz wenig Normalnatronlauge.

Brutschrank. Der Toluolzusatz dient außer zur Desinfizierung zum Fernhalten des Sauerstoffs, in dessen Gegenwart die Xanthinoxydase Hypoxanthin zu Xanthin und dieses weiter zu Harnsäure oxydieren würde. Nach den Erfahrungen bei den Reduktasen kann man jedoch Zweifel hegen über die hinreichende Wirksamkeit dieser Absperrmethode, namentlich während einer so langen Bebrütung, und es wäre daher wohl auch hier ratsamer, die ebenso einfache als zweckmäßige Sauerstoffabsperrmethode mittels pyrogallolgetränkter Wattebauschen, welche Burri in die Praxis der im letzten Kapitel dieses Buches besprochenen Reduktasebestimmung eingeführt hat, auch hier zu verwenden.

Nach vollendeter Fermentwirkung wird — für den Nachweis der Adenase — schwach mit Essigsäure angesäuert, aufgeköcht, vom Eiweißkoagulum abfiltriert, dieses noch mehrmals mit verdünnter Essigsäure aufgeköcht, filtriert, die vereinigten Filtrate mit Ammoniak alkalisiert, wieder filtriert und das klare Filtrat mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt. Nach einigen Stunden wird der Niederschlag abfiltriert, mit verdünntem Ammoniak sorgfältig ausgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt, Salzsäure hinzugefügt und (eventuell nach Vorbehandlung mit Tierkohle) zur Trockne verdampft, wiederum Wasser zugefügt und nochmals verdampft, bis der Rückstand nur noch ganz schwach sauer reagiert. Dann wird derselbe in 50—80 ccm Wasser unter mäßigem Erwärmen digeriert und nach dem Erkalten noch 3—4 Stunden stehen gelassen. Der Rückstand dient der Ermittlung von Xanthin und Harnsäure, während das Filtrat auf unverändertes Adenin und Hypoxanthin verarbeitet wird. Nach der Vorprüfung einiger Tropfen des Filtrates mit ungefähr ebensoviel 1%iger alkoholischer Pikrinsäurelösung auf unverändertes Adenin, welches als Adeninpikrat ausfällt, kann beim Entstehen einer Trübung die Reaktion an einer größeren Filtratmenge wiederholt, der Niederschlag sofort abgesaugt und mit kaltem Wasser nachgewaschen werden. Er besteht nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser aus dunkelgelben Prismen. Das Filtrat wird nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure mit Benzol oder Toluol ausgeschüttelt, um dasselbe von dem Pikrinsäureüberschuß zu befreien. Dann wird Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion hinzugefügt und das gebildete Hypoxanthin mit ammoniakalischer Silberlösung ausgefällt. Hierauf wird der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtriert, das Filtrat eingeengt und der Rückstand in 20 ccm einer aufs 10fache mit Wasser verdünnten konzentrierten Salpetersäure gelöst. Nach dem Erkalten scheiden sich dann wetzsteinförmige Kristalle von Hypoxanthinnitrat ab.

Handelt es sich um die Ermittlung der Guanase, so wird das Reaktionsgemisch nach vollzogener Fermentwirkung mit 15 ccm konzentrierter Schwefelsäure 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht, hierauf nacheinander erst mit Natronlauge alkalisiert, dann mit Essigsäure wieder bis zur schwach sauren Reaktion versetzt und durch Aufkochen und Filtration von Eiweiß befreit. Das suspendierte Koagulum wird hierauf nochmals durch Natronlauge heiß gelöst und aufs neue mit Essigsäure gefällt. In den vereinigten Filtraten werden hierauf die Purinderivate nach der Kupfersulfat-Bisulfitmethode von Krüger ausgefällt, der aus Kupferoxydulverbindungen bestehende Niederschlag abfiltriert, gründlich mit heißem Wasser ausgewaschen, in heißem Wasser suspendiert, Schwefelwasserstoff eingeleitet, aufgekocht, filtriert und das Filtrat nach Zusatz von Salzsäure eingeengt. Man fügt dann nochmals Wasser zu, erhitzt mit etwas Natronlauge bis zur völligen Lösung und fällt nach der Neutralisation mit Essigsäure wiederum nach der Kupfersulfat-Bisulfitmethode. Der Niederschlag wird gleich wie nach der ersten Fällung weiter behandelt und die salzsaure Lösung vollständig bis zur Trockne auf dem Wasserbad eingedampft, was unter Zusatz von frischem Wasser wiederholt wird, bis die überschüssige Salzsäure entfernt ist. Hierauf wird der Rückstand mit 100 ccm verdünntem Ammoniak behandelt und in den Eisschrank gestellt. Unverändertes Guanin und Harnsäure fallen hierbei aus, während das Xanthin erst nach dem Einengen der Lösung in Schollen erhalten wird, die, um völlig sicher zu gehen, der Elementaranalyse unterworfen werden sollen.

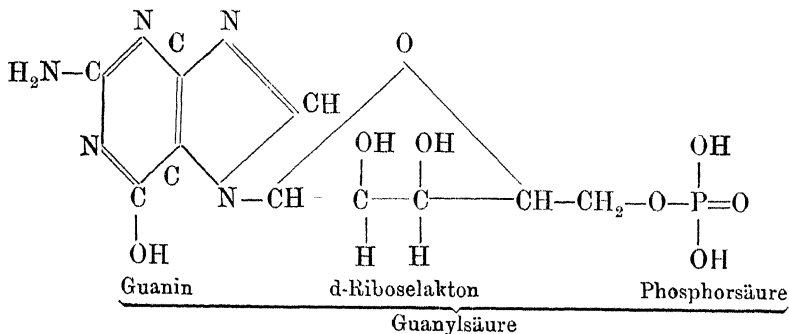
Daß es sich bei Adenase und Guanase um zwei verschiedene Fermente handelt, wie Jones (loc. cit.) und mit ihm zahlreiche Forscher angenommen haben, kann durchaus nicht als erwiesen gelten, wie dies im Zusammenhang mit der Frage besonderer Nukleosidamidasen noch erörtert werden soll. Jedenfalls dürfte es sich nur um solche Differenzen handeln, wie sie durch Anpassung an gewisse Besonderheiten der Substrate bei vielen aus einem Grundtypus hervorgehenden Hydrolasen entstehen. Je näher die Substrate einander verwandt sind, desto enger ist auch die Beziehung der Fermentvarietäten, denen die Spaltung jener Substrate obliegt.

Physiologisch noch wichtiger als die Desamidierung der freien Purinbasen sind die Desamidierungsvorgänge, die sich am Guanin und Adenin vollziehen vor der Lösung ihrer glykosidartigen Bindung an das Kohlenhydrat (meist Ribose)¹⁾, in den von Levene²⁾ als Nukleo-

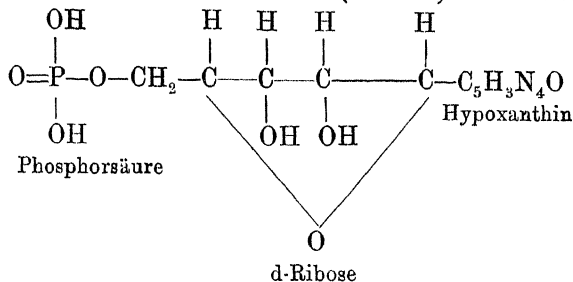
¹⁾ Die Stelle der Ribose kann eine unbekannte Hexose vertreten. Siehe z. B. Mandel u. Dunham, Journ. Biol. Chem. 11 (1912) 85; Steudel, Zeitschrift f. physiol. Chem. 77 (1912) 497.

²⁾ Levene u. Medigreceanu, Journ. Biol. Chem. 9 (1911) 65, 389;

side (Guanosin und Adenosin) bezeichneten Körpern. Die Nukleoside gehen ihrerseits aus den einfachsten pyrimidinfreien, von Levene (loc. cit.) Nukleotide genannten Nukleinsäuren, deren Typus die Guanylsäure des Pankreas ist, durch Abspaltung von Phosphorsäure hervor. Es kann sich offenbar auch schon an den Nukleotiden selbst die Desamidierung geltend machen, da neben der Guanylsäure und dem entsprechenden Nukleotid, welches Adenin an Stelle von Guanin enthält, auch die desamidierten Produkte dieser einfachsten Nukleinsäuren in der Natur aufgefunden worden sind, so insbesondere die Inosinsäure. Im Sinne der Aufklärung, welche die Konstitution der Nukleinsäuren durch Levene (loc. cit.) erfahren hat, wäre die Guanylsäure folgendermaßen zu formulieren (wenn man bei der Synthese, was der Verfasserin am wahrscheinlichsten zu sein scheint, die Imidogruppe des Guanins in Reaktion mit dem noch freien endständigen OH der Aldehydhydratgruppe des d-Riboselaktons treten läßt):



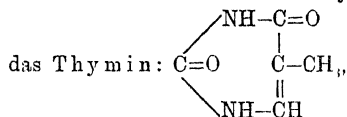
Die Inosinsäure besitzt nach Levene (loc. cit.) die Konstitution:



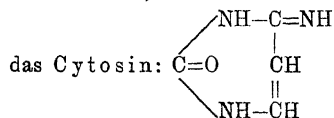
siehe ferner Dieselben, Ebenda 9 (1911) 375; Dieselben u. Jacobs, Ebenda 11 (1912) 371; Levene u. Jacobs, Ebenda 12 (1912) 377, 411; Ber. d. chem. Ges. 43 (1910) 3150, 44 (1911) 1027, 45 (1912) 608; siehe ferner über die Konstitution der Nukleinsäuren und ihrer Derivate: Schittenhelm u. Brahm in Oppenheimers Handb. d. Biochem., Bd. 1, Jena 1908; Brahm, Ebenda, Ergänzungsband, 1913; Steudel, loc. cit. vorige Fußnote.

Die einfacheren und die komplizierter zusammengesetzten Nukleinsäuren, wie auch möglicherweise schon deren Desamidierungsprodukte sind dann ihrerseits wieder in den Nukleoproteiden der Zellkerne mit Eiweißkörpern oder eiweißähnlichen Verbindungen verankert, die selbst wieder andere Gruppen tragen können (Eiweißpaarlinge): Ein solch kompliziertes System repräsentieren die kernhaltigen Blutkörperchen der Vögel und Reptilien. Während bei den kernlosen Blutkörperchen der Eiweißkörper des Hämoglobins, das Globin, nur mit dem eisenhaltigen Blutfarbstoff, dem Hämatin, verknüpft ist, ist bei den kernhaltigen das Globin einerseits mit dem Hämatin, anderseits mit den Nukleinsäuren der Zellkerne zum komplizierten Nukleoprotein vereinigt. In anderen Fällen, wie in der Thymusdrüse oder in manchen unreifen Geschlechtszellen stellen die Nukleoproteide Verbindungen der Nukleinsäuren mit schwach basischen Eiweißkörpern, den Histonen, oder in manchen reifen Geschlechtszellen mit den stark basischen aus den Histonen hervorgehenden Protaminen dar (Salmin, Sturin). Die Zerlegung der Eiweißkerne ist den gewöhnlichen Proteasewirkungen zu subsummieren. Ihr geht wahrscheinlich meist voraus die Lösung der Bindung zwischen Eiweiß und Nukleinsäuren, deren Eigenart vielleicht wiederum eigene Fermente oder wenigstens spezifisch auf diese erste Spaltungsphase eingestellte Proteasen verlangt. Die besondere Widerstandsfähigkeit des lebenden Eiweißes gegenüber den gewöhnlichen Proteasen könnte gerade in den hier in Frage kommenden Fällen¹⁾ in der intakten Bindung zwischen Nukleinsäuren und nativem Eiweiß, wie sie in den Nukleoproteiden²⁾ der Zellkerne vorliegt, zu suchen sein.

bei tierischen Nukleinsäuren das Methylderivat des Uracils,



und ein Imidouracil,



¹⁾ Ueber andere Ursachen der Resistenz des lebenden Eiweißes s. in einem früheren Abschnitt.

²⁾ Ueber die Nukleoproteidaufspaltung bei der Autolyse siehe Salomon, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1881) 361; Biondi, Virchows Archiv **144** (1896) 373; Schmidt-Nielsen, Hofmeisters Beitr. **3** (1902) 266; Reh, Ebenda **3** (1903) 569; Araki, Zeitschr. f. physiol. Chem. **38** (1903) 84; Neuberg u. Milchner,

Die Funktionsprüfung der Pankreasdrüse mittelst der Kernprobe von Schmidt. Auf die besonders hohe Spaltungsfähigkeit, welche das Sekret der Pankreasdrüse gegenüber den erwähnten Bindungen besitzt, hat Schmidt¹⁾ eine Funktionsprüfung der Pankreasdrüse gegründet. Er bedient sich dabei in Säckchen eingenähter Würfel aus Ochsenfleisch oder Thymusgewebe, deren zahlreiche Zellkerne dem sichtbaren Angriff durch den Magensaft entgehen, während sie bei normaler Funktion der Pankreasdrüse der Auflösung verfallen. Es handelt sich dann darum, im Stuhl das Vorhandensein oder Fehlen der Zellkerne mikroskopisch festzustellen. Sind die Zellkerne durch die Protease- und „Nuklease“-Wirkung des Pankreassekretes aufgelöst worden, so funktioniert die Drüse normal²⁾.

Die Teilphasen der Aufspaltung der Nukleoproteide. Für die Aufspaltung der Nukleoproteide der Zellkerne kommen durchschnittlich sechs differierende hydrolytische Vorgänge in Betracht, die den verschiedenartigen Bindungen entsprechen, und zwar:

1. Aufspaltung der Bindung zwischen Eiweiß und Nukleinsäuren (Wirkung von Pepsinasen oder verwandten Fermenten).
2. Aufspaltung des Eiweißkernes (Wirkung gewöhnlicher Proteasen), [Pepsinasen, (Tryptasen), Peptasen].
3. Aufspaltung der Nukleinsäuren.
- 3a. Aufspaltung der komplizierten Nukleinsäuren in Nukleotide (Wirkung der als „Nuklease“ bezeichneten, wahrscheinlich an den Brückensauerstoffatomen der Polyphosphorsäuren angreifenden Hydrolase³⁾).
- 3b. Aufspaltung der Nukleotide in Nukleoside (Wir-

Berliner klin. Wochenschr. (1904) 41; Mitchell, Journ. Biol. Chem. 1 (1906) 503; F. Sachs, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46 (1906) 336; Hahn u. Geret, Zeitschr. f. Biol. 40, 117.

¹⁾ Adolf Schmidt, Deutsches Archiv f. klin. Medizin 104; Deutsche med. Wochenschr. (1908) 997; 21. Kongreß f. innere Medizin, Leipzig 1914; Kashiwado, Deutsches Archiv f. klin. Medizin 104.

²⁾ Siehe ferner hierzu Strauch, Deutsche med. Wochenschr. (1909) 2310; Wynhausen, Berliner klin. Wochenschr. (1909) 1406, (1910) Nr. 11, sowie die Arbeiten von Einhorn, Kenthe, Walko; vgl. über dieselben Korczynski, Wiener klin. Wochenschr. (1910) 1172; vgl. demgegenüber Hesse, Deutsche med. Wochenschr. (1909) 121; Brugsch, Ebenda (1909) 2307; Kraus, Ebenda (1909) 2333; Schittenhelm, Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. des Stoffwechsels, 1910, Nr. 49.

³⁾ Siehe z. B. die Formel für die Hefenukleinsäure S. 447.

kung der die Phosphorsäure von den Kohlenhydrat + Basenkomplexen lösenden, also esterspaltenden Nukleotidasen)¹⁾.

3c. Aufspaltung der Nukleoside in Kohlenhydrat + Basen (Wirkung der glykosidspaltenden Nukleosidase)²⁾.

Neben diesen verschiedenartigen, früher einem einheitlichen Ferment — der Nuklease — zugeschriebenen hydrolysierenden Einflüssen, die teils zu den eiweißspaltenden, teils zu den esterspaltenden, teils zu den glykosidspaltenden Fermentwirkungen gehören, und die erst Levene in ihrer Heterogenität erkannt und in der angegebenen Weise bezeichnet hat, laufen dann

4. die desamidierenden Wirkungen, die sowohl an den freien wie an den gebundenen Purinen angreifen können. Der letztere Weg scheint der unter physiologischen Bedingungen gangbarste zu sein, wohl aus dem einfachen Grund, weil die gebundenen Purine leichter desamidiert werden als die freien. Es ist dieser Unterschied, der sich aus Versuchen von Jones und seinen Mitarbeitern³⁾, sowie Befunden von Schittenhelm⁴⁾ ergibt, für das Vorkommen besonderer Nukleosidamidasen ins Feld geführt worden, welche Guanosin zu Xanthosin und Adenosin zu Inosin desamidieren. Hierauf würde erst durch die Tätigkeit zweier (wiederum als untereinander und von den Guanosin und Adenosin direkt spaltenden Nukleosidasen verschieden angenommenen) Nukleosidasen: der Xanthosinhydrolase und der Inosinhydrolase der desamidierte Komplex in Kohlenhydrat und Xanthin bzw. Hypoxanthin zerlegt. Die leichtere Angreifbarkeit der gebundenen Purinamide steht jedoch, ohne daß eine so sehr komplizierende Vorstellung wie diejenige verschiedener Fermente für denselben Angriffsort und dieselbe Angriffsart zu Hilfe gezogen werden muß, mit zahlreichen Beobachtungen in Uebereinstimmung, die eine Zunahme der Reaktionsfähigkeit mit dem Eingehen chemischer Bindungen des betreffenden Komplexes ergeben haben. Wenn also freies Guanin und noch mehr freies Adenin durch ein Organextrakt nicht verändert werden, während die entsprechenden Verbindungen mit d-Ribose eine glatte Spaltung erleiden, so wäre dies nicht auf das Fehlen der Guanase resp. Adenase und das Vorhandensein einer Nu-

¹⁾ Synonym der Phosphornuklease von Amberg u. Jones, loc. cit.

²⁾ Synonym der Purinnuklease von Amberg und Jones.

³⁾ loc. cit. sowie Leonard u. Jones, Journ. Biol. Chem. 6 (1909) 453; Jones, Zeitschr. f. physiol. Chem. 65 (1910) 383; Vögtlin u. Jones, Ebenda 66 (1910) 250; Jones, Journ. Biol. Chem. 9 (1911) 129, 169

⁴⁾ Schittenhelm u. K. Wiener, Zeitschr. f. physiol. Chem. 77 (1912) 77.

kleosidamidase zurückzuführen, sondern einfacher darauf, daß das Organextrakt genügend Guanase oder Adenase enthält, um aus dem reaktionsfähigen Nukleosid Ammoniak abzuspalten, nicht aber genug, um das schwerer angreifbare freie Guanin oder Adenin zu desamidieren¹⁾. Ähnliche Ueberlegungen müssen auch für die Prüfung der Frage der Identität der als Guanase und Adenase bezeichneten Fermente herangezogen werden. Desamidierende Wirkungen auf Guanin sind bei Organextrakten allgemeiner verbreitet als die entsprechenden Wirkungen auf Adenin. Dies kann jedoch auch ohne die Postulierung zweier Fermente einfach dadurch erklärt werden, daß das Guanin, welches die Aminogruppe in anderer Stellung enthält als das Adenin und um ein OH reicher ist als dieses, reaktionsfähiger ist als das Adenin, eine Auffassung, die ich der Zweifermenttheorie als andere mögliche Deutung der Versuchsergebnisse gegenüberstellen möchte. Dagegen ist natürlich das desamidierende Prinzip von der endoenzymatischen Nukleosidase scharf zu trennen, und diese wiederum von der Nukleotidase, der Nukleinase und den an der Aufspaltung der Nukleoproteide beteiligten Pepsinasen und Trypsinasen, entsprechend den vorhin angegebenen ungleichartigen Teilphasen des Prozesses. Je nach dem zu prüfenden Material und wohl auch der Reaktion des Mediums²⁾ sind die verschiedenen fermentativen Wirkungen auch ungleich entwickelt. So zeigt Darmsaft³⁾ die auf dem ziemlich allgemein verbreiteten Nukleinaseeinfluß beruhende Eigentümlichkeit, Nukleinsäure in Eisessig löslich zu machen, sowie Phosphorsäure aus Guanylsäure und den komplizierteren Nukleinsäuren (Pyrimidinnukleo-

¹⁾ Vielleicht tritt auch die hemmende Wirkung der Spaltprodukte, welche Schittenhelm bei der Guanase- und Adenasewirkung festgestellt hat, in geringerem Maße auf, wenn ein Kohlenhydratpurinkomplex neben dem in relativ geringer Menge gebildeten Ammoniak entsteht, als wenn ein freies Purin neben Ammoniak auftritt.

²⁾ Wie bei fast allen Fermenten hemmen stärkere Säuren und Basen; dagegen scheinen die Mehrzahl der hierher gehörigen Enzyme durch schwache Säuren in ihrer Wirkung günstig beeinflusst zu werden. Milchsäure besitzt jedoch nach Arinkin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53 (1907) 192, eine besonders starke hemmende Wirkung, was vielleicht für den nur schwach ausgeprägten Nukleaseeinfluß der Muskelextrakte verantwortlich gemacht werden kann.

³⁾ Ueber die Einwirkung von Magensaft, Pankreassaft und Darmsaft auf die Nukleinsäuren siehe Nakayama, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41 (1904) 348; Abderhalden u. Schittenhelm, Ebenda 47 (1906) 452; Arch. di Fisiol. 4, Heft 1; Biochem. Zentralbl. 6 (1907) 2515; Glaeßner u. Popper, Deutsches Archiv f. klin. Medizin 94 (1908) 46; Levene, loc. cit.; von Pankreasextrakt (welches nukleasehaltig ist) Milroy, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22 (1896) 307.

tide) abzuspalten, während die Fähigkeit, die gebildeten Nukleoside weiter zu zerlegen, fehlt¹⁾. Die frühere Auffassung, welche neben den Purindesamidasen eine einheitliche Nukleinsäure spaltende Nuklease annahm, entspricht jedenfalls den Tatsachen nicht. Es müßten im Gegenteil deren drei ausgeprägte Komponenten: Nukleinasase, Nukleotidase und Nukleosidase den verschiedensten hydrolysierenden Fermentgruppen zugeordnet und von den Desamidasen völlig getrennt werden. Hierdurch würden aber hydrolysierende Enzyme auseinandergerissen, die biologisch in der nächsten Beziehung zueinander stehen, die im Stoffwechsel der Zellkerne einander am selben Substrat in die Hände arbeiten und die überall dort zu erwarten sind, wo in der Natur Zellkerne zerfallen. Es soll daher jener unter den Sammelbegriff der Nukleasen fallende Fermentkomplex der Nukleinasen, Nukleotidasen und Nukleosidasen an dieser Stelle eingeschaltet werden im Anschluß an die Desamidasen und überleitend zu den im folgenden Abschnitt besprochenen Esterasen, zu welchen Enzymen ein Teil der Nukleasen zu rechnen ist.

Die Ermittlung der Nukleasen.

Da schon im vorigen, im Zusammenhang mit den Desamidasen, das auch zu deren Verständnis Notwendige über die Theorie der Wirkung der als Nukleasen bezeichneten Fermente besprochen worden ist, so kann hier auf jene Ausführungen verwiesen werden.

Leider hat die analytische Forschung mit der Theorie nicht gleichen Schritt gehalten, da sie im allgemeinen, ohne die ganz verschiedenartigen Teilphasen des fermentativen Nukleinsäureabbaus zu differenzieren, lediglich auf das Verschwinden der als Substrat dienenden Nukleinsäure oder auf das Auftreten von freien Purinbasen unter den Spaltprodukten abstellt und beides einer einheitlichen Nuklease zuschreibt.

Was die Verbreitung anbetrifft, so sind die Leukozyten reich an Nukleasen²⁾; ferner die kernhaltigen roten Blutkörperchen³⁾; Karzinome⁴⁾; die tätige Brustdrüse⁵⁾; andere Drüsen, wie Thymus, Pankreas, Schilddrüse, Nebenniere⁶⁾ Hoden⁷⁾

¹⁾ London u. Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. **70** (1910) 10; Jones, Journ. Biol. Chem. **9** (1911) 169, **12** (1912) 31.

²⁾ Tschernorutzki, Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**, 298; Biochem. Zeitschrift **44** (1912) 353.

³⁾ Satta u. Lattes, Giorn. Reale Accad. med. di Torino **71**, 88; Biochem. Zeitschr. **8**, 1421.

⁴⁾ Goodman, Journ. of experim. Med. **15** (1912) 177.

⁵⁾ Borrino, Arch. di Fisiol. **8** (1910) 73.

und die übrigen Organe (Niere, Milz, Leber, Gehirn, Lunge) offenbar nach Maßgabe ihres Kerngehaltes. Auch bei Pflanzen sind es die vielkernigen Zellen niedriger und höherer Pilze und Algen¹⁾ sowie die einen den Kern vertretenden Zentralkörper, resp. gelöste Kernsubstanzen besitzenden Bakterien, und bei Phanerogamen die Keimlinge, in denen die Nukleasen am auffälligsten hervortreten. So hat Iwanoff²⁾ ein wirksames nukleasehaltiges Extrakt aus dem gewaschenen sporentragenden Mycel von Schimmelpilzen durch Trocknen bei 30°, Zerreiben mit Kieselgur und etwas Wasser im Mörser und Filtration des Extraktes dargestellt³⁾, und Kikkoji⁴⁾ hat eine Nuklease durch Aussalzen des neutralen Preßsaftes des japanischen Hutpilzes *Cortinellus edodes* mittels Ammonsulfat erhalten. Es ist dies eine Methode, mit deren Hilfe sich auch aus tierischen Organen ein wirksames Trockenpräparat durch Behandeln des mit Ammonsulfat erhaltenen Niederschlags mit Alkohol und Aether gewinnen läßt, wie dies Sachs⁵⁾ bei mit Kieselgur und Sand zerriebenem und nach Buchner ausgepreßtem Pankreas durchgeführt hat.

Die Feststellung des Verschwindens oder der Abnahme der Nukleinsäuren.

Dieselbe erfolgt bei dem gegenwärtigen Stand der analytischen Forschung auf diesem Gebiete entweder durch die Verflüssigung oder durch die Abnahme der Rechtsdrehung von Nukleinsäure.

a) Die Nukleinsäureverflüssigung.

Zu dem Zweck bedient man sich des von F. Sachs (loc. cit.) empfohlenen Natriumsalzes der α -Thymonukleinsäure von mutmaßlich folgender Konstitution⁶⁾ (S. 454):

Das α -thymonukleinsäure Natrium wird in einer 4%igen wäßrigen Lösung verwendet, die in unverändertem Zustand bei höherer Temperatur flüssig ist, während sie bei Zimmertemperatur erstarrt. Wird der warmen Lösung jedoch unter Toluolzusatz eine bestimmte Menge eines nukleasehaltigen Extraktes (wie es z. B. aus dem zu prüfenden, gut zerkleinerten, mit dem doppelten Wasservolumen und Toluol oder Chloroform kurze Zeit bei Zimmertemperatur behandelten Organ durch

¹⁾ Juschtschenko, Zeitschr. f. physiol. Chem. 75 (1911) 141 Biochem. Zeitschrift 31 (1911) 377; Arch. Sciences Biol. St. Petersburg 17 (1912) 1.

²⁾ Juschtschenko, loc. cit. vorige Fußnote; Mihara, Zeitschr. f. physiol. Chem. 75 (1911) 443.

³⁾ Teodoresco, Compt. rend. 155 (1912) 300, 464, 544.

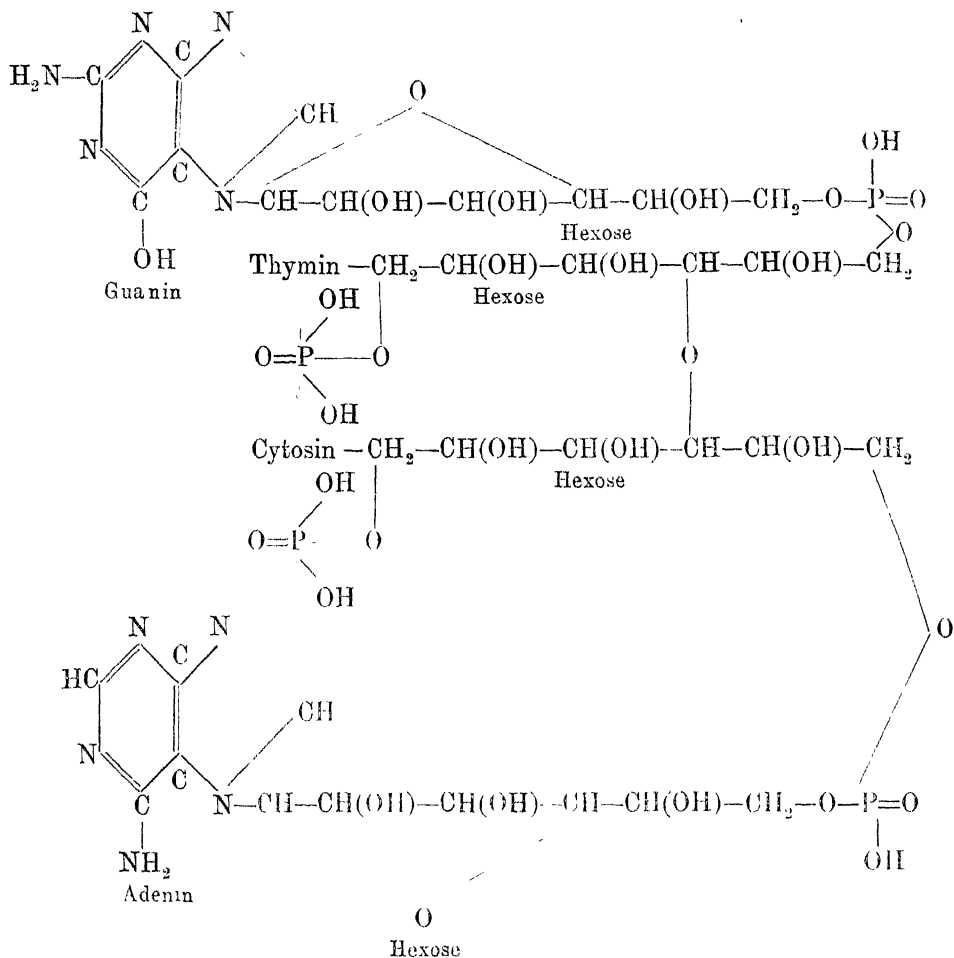
⁴⁾ Iwanoff, Zeitschr. f. physiol. Chem. 39 (1903) 31.

⁵⁾ Siehe ferner über Nukleasen in Schimmelpilzen Dox, U.S. Dep. agricult. (1910), Bull. 120.

⁶⁾ Kikkoji, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51 (1907) 201.

⁷⁾ Sachs, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46 (1906) 336.

⁸⁾ Siehe die Konstitutionsformel von Levene u. Jacobs, Journ. Biol. Chem. 12 (1912) 377, 411.



Kolieren und Filtration gewonnen wird) hinzugefügt und das Gemisch während 24 Stunden im Brutschrank gehalten, so wird der Inhalt des Schälchens bei Nukleasegegenwart auch nach dem Abkühlen flüssig bleiben. Ob alle α -Thymonukleinsäure umgewandelt ist, läßt sich nach Abderhalden und Schittenhelm ¹⁾ in der Weise feststellen, daß man die Lösung schwach mit Essigsäure ansäuert, heiß filtriert und das Filtrat nach dem Abkühlen mit 96%igem Alkohol und wenig 5%iger Natriumazetatlösung versetzt, bis kein α -thymonukleinsaures Natrium mehr ausfällt. Dieser Niederschlag wird dann in etwas

¹⁾ Abderhalden u. Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47 (1906) 452.

heißem Wasser gelöst und durch Abkühlen festgestellt, ob das α -thymonukleinsäure Natrium seine Gelatinierungsfähigkeit vollständig verloren hat oder nicht.

Niedrige Organismen, wie Bakterien und Schimmelpilze, können durch direktes Impfen der mit α -thymonukleinsäurem Natrium beschickten Schälchen mit dem fraglichen Mikroorganismenmaterial auf dessen Verflüssigungsvermögen geprüft werden ¹⁾.

An Stelle des α -thymonukleinsäuren Natriums empfehlen Schittenhelm u. F. Schröter²⁾ für den Nachweis der Verflüssigung durch lebendes Material eine für die fraglichen Bakterien geeignete Nährlösung, welche im Liter Wasser 15 g nukleinsäures Natrium, 6 g Kochsalz, 0,3 g Magnesiumsulfat und 0,1 g Chlorkalzium enthält.

b) Die polarimetrische Ermittlung der Nukleinsäurespaltung.

Diese von Pighini³⁾ in die Praxis der Nukleasebestimmung eingeführte Methode eignet sich für jede völlig klare fermenthaltige Flüssigkeit tierischen oder pflanzlichen Ursprungs. Sie wird in der Weise ausgeführt, daß 20 ccm einer 1,6 g Nukleinsäure (Merck) auf 100 ccm physiologische Kochsalzlösung (der 12 Tropfen Ammoniak zugefügt werden) enthaltenden Lösung mit 2 ccm des zu prüfenden Extraktes usw. vermischt und sofort nach der Mischung polarisiert werden. Das Polarisationsrohr wird dann in einen Thermostaten von 37° verbracht und nach bestimmten Zeitintervallen die polarimetrische Änderung festgestellt, wobei natürlich von der Anfangs- bis zur Endablesung dieselbe Temperatur (am besten 37°) eingehalten werden muß. Gleichzeitig mit dem Hauptversuch wird ein Kontrollversuch angesetzt, bei welchem die 2 ccm der Untersuchungsflüssigkeit durch 2 ccm physiologische Kochsalzlösung ersetzt sind, um eine eventuelle Eigenveränderung der Nukleinsäure während der Versuchsdauer in Abzug bringen zu können. Wie weit die Differenz der Drehungen als ein Maß für den Nukleaseeffekt der untersuchten Flüssigkeit betrachtet werden kann, hängt bei ein und derselben Nukleinsäure von der mehr oder weniger tiefgreifenden Spaltung ab. Je weniger weit dieselbe geht, desto eher darf man eindeutige und einer Fermentwirkung zukommende — nicht durch die Uebereinanderlagerung der

¹⁾ Schittenhelm u. F. Schröter, loc. cit. folgende Fußnote; Plenge, Zeitschr. f. physiol. Chem. 39 (1903) 190.

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 39 (1903) 203, 40 (1904) 62, 41(1904) 4.

³⁾ Pighini, Zeitschr. f. physiol. Chem. 70 (1910) 85; siehe ferner Neuberger, Biochem. Zeitschr. 30 (1911) 505; Amberg u. Jones, Journ. Biol. Chem. 10 (1911) 81.

Drehung der verschiedensten mehr oder weniger weit abgebauten Produkte getrübt — Resultate erwarten, und umgekehrt dürfte die optische Methode bei einem tieferen Abbau ohne die genaueste Kenntnis des Chemismus der Reaktion kaum mehr als den qualitativen Nachweis vorhandener Nukleasen auf Grund der einsetzenden Drehungsänderung ermöglichen ¹⁾).

Die Feststellung des Auftretens von Spaltprodukten der Nukleinsäuren.

Während die Verflüssigung und die optische Veränderung schon bei einer der ersten Spaltungsphase (Nukleinasewirkung) entsprechenden Veränderung in die Erscheinung treten dürften, ist die Ermittlung von Spaltprodukten an die ganze Stufenfolge der Abbaureaktionen gebunden. Sie schließt also auch die Nukleosidasewirkung, welche die Purinbasen aus den Nukleosiden in Freiheit setzt, ein. Der negative Ausfall der Proben auf freie Purinbasen bei bestehendem Verflüssigungsvermögen würde also dahin zu deuten sein, daß zwar Nukleinase und eventuell auch Nukleotidase, nicht aber Nukleosidase vorhanden ist. Die Frage, ob nur Nukleinase oder auch außerdem Nukleotidase zugegen ist, würde durch die Ermittlung von anorganischem Phosphor gelöst, da die Funktion der Nukleotidasen ja gerade in der Abspaltung freier Phosphorsäure aus den Nukleotiden besteht. Es kann daher keine der erwähnten Methoden die andere ersetzen. Sie ergänzen sich vielmehr gegenseitig und gestatten erst in ihrer Gesamtheit ein Bild über den Charakter der Nukleinsäurespaltung in irgend einem bestimmten Fall und die so notwendige Differenzierung unter den Nukleasen.

a) Die Ermittlung der Nukleotidase.

Wie soeben ausgeführt, basiert dieselbe auf der Bestimmung des in Freiheit gesetzten anorganischen Phosphors nach bekannten Methoden ²⁾. Nach Tschernorutzki ³⁾ geschieht dies in der Weise, daß man die Mischung einer abgemessenen Menge des zu prüfenden

¹⁾ Vgl. Levene u. Medigreceanu, Journ. Biol. Chem. 9 (1911) 65, 389.

²⁾ Ueber die Trennung der anorganischen und organischen Phosphorverbindungen siehe die Methode von Stutzer, Biochem. Zeitschr. 7 (1908) 471. Zur Phosphorbestimmung selbst wird die alkalimetrische Methode von A. Neumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 37 (1902) 114; siehe auch Gregersen, Ebenda 53 (1907) 453, empfohlen. Ueber Ammoniakentfernung siehe Bang, Biochem. Zeitschr. 32 (1911) 443.

³⁾ Tschernorutzki, Biochem. Zeitschr. 44 (1912) 353.

Organextraktes usw. mit einer bestimmten Menge nukleinsäuren Natrons unter Toluolzusatz 1—2 Tage sich selbst bei Brutschranktemperatur überläßt, hierauf bei 80—90° trocknet und den anorganischen Phosphor bestimmt. Außer dem Hauptversuch wird eine Kontrolle, mit denselben Mengen, aber zuvor (durch Kochen über der offenen Flamme während 10 Minuten) abgetötetem Fermentextrakt angesetzt, um Täuschungen durch Selbstzersetzung der Nukleinsäure unter den Versuchsbedingungen auszuschalten.

b) Die Ermittlung der Nukleosidase.

Da die Wirkung dieses Ferments in der Lösung der Kohlenhydrat-Purinbasenbindung besteht, so muß sich sein Vorhandensein in dem Auftreten der beiden Spaltprodukte, also der d-Ribose (oder einer die d-Ribose vertretenden Hexose) und der Purinbasen dokumentieren. Merkwürdigerweise wird die viel einfacher scheinende Ermittlung des Kohlenhydrats ¹⁾ kaum benutzt.

Die Prüfung auf Purinbasen geschieht wie folgt ²⁾: 50 ccm des zu untersuchenden Organextraktes werden mit der gleichen Menge der schon erwähnten 4%igen Lösung von α -thymonukleinsäurem Natrium oder auch hefenukleinsäurem Natrium und Toluol vermischt und das Gemisch während 2—3 Tagen im Brutschrank bei 37—38° gehalten. Nach der Filtration wird noch vorhandene Nukleinsäure durch 10%ige Schwefelsäure ausgefällt, wieder filtriert und im Filtrat die Purinbasen mittels einer Quecksilbersulfatlösung, die 75 g Quecksilberoxyd in 500 ccm 15 volumprozentiger Schwefelsäure (in der Hitze gelöst) enthält ³⁾, ausgefällt. Der Niederschlag wird dann abgesaugt, in Wasser aufgeschwemmt und nach dem Ansäuern mit Salzsäure mit Schwefelwasserstoff behandelt. Nach nochmaliger Filtration wird der Schwefelwasserstoff entfernt, indem man einen Luftstrom durch das Filtrat hindurchleitet. Dann wird eine (durch Auflösen von 26 g Silbernitrat in überschüssigem Ammoniak und Auffüllen mit Wasser auf 1 Liter erhaltene) ammoniakalische Silberlösung hinzugefügt, der Silberniederschlag abfiltriert, gründlich ausgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und mittels Salzsäure in der Wärme zersetzt. Nach dem Abfiltrieren

¹⁾ Aenderung des Reduktionsvermögens und bei der d-Ribose charakteristische Pentosereaktionen wären zu erwarten, auch wenn wegen der Komplikation durch die Nukleinsäuredrehung die optischen Aenderungen nicht berücksichtigt werden.

²⁾ Siehe Wohlgemuth, Grundriß der Fermentmethoden, Berlin 1913. S. 237, 238.

³⁾ Siehe Kossel u. Pathen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 38 (1903) 39.

des Chlorsilbers wird noch ganz wenig Schwefelwasserstoff durch die Lösung geleitet und nochmals filtriert. Das salzsaure Filtrat wird dann so weitgehend eingedampft, daß sich die Purinbasen quantitativ aus der Lösung ausscheiden. Die Identifizierung der erhaltenen Kristalle als Purinbasen erfolgt nach Burian¹⁾ mittels deren Diazoaminoverbindungen²⁾, ihre Bestimmung durch Wägen des mit Alkohol und Aether getrockneten kristallinen Niederschlags.

Esterasen (Lipasen).

Den Eiweißkörpern und Kohlenhydraten stehen als dritte und letzte große Gruppe der Nahrungsdepots in der Natur die Fette gegenüber, und der Werkzeugkasten, dessen sich komplizierte und einfache Lebewesen zur Beschaffung ihres Nährmaterials bedienen, würde eine wesentliche Lücke aufweisen, wenn in demselben keine Agenzien vertreten wären, welche die Fette ihrem natürlichen Zweck zugänglich machen.

Eine solche Lücke ist nun, wie dies bei der natürlichen Anpassung der Lebewesen an die vorhandenen Existenzbedingungen kaum anders zu erwarten ist, nicht vorhanden. Wir finden vielmehr sowohl im Tier- als im Pflanzenreich auf der ganzen Stufenleiter der Entwicklung Repräsentanten vor, welche das Vermögen zur Fettaufspaltung besitzen, und sie verdanken diese ihre Fähigkeit dem Gehalt an bestimmten, die Fetthydrolyse beschleunigenden Enzymen, den Lipasen.

Im Verdauungstraktus der Säugetiere, aber auch bei Wirbellosen³⁾, spielen diese insbesondere auf die Verseifung der Neutralfette Palmitin, Stearin und Olein eingestellten Enzyme⁴⁾ eine große Rolle. Es findet sich Lipase im Pankreas⁵⁾, Magen⁶⁾ und Darmsaft⁷⁾ so-

¹⁾ Burian, Ber. d. chem. Ges. 38 (1904) 696.

²⁾ Siehe über die Ausführung dieser Reaktion Pauly, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52 (1904) 516.

³⁾ Biedermann, Archiv f. d. ges. Physiol. 72 (1898) 157; Bonnoure, Compt. rend. 152 (1911) 228.

⁴⁾ Siehe die vielen Arbeiten Pflügers über diesen Gegenstand in seinem Archiv, vor allem Bd. 80 (1900) 133; 81 (1900), 375; 85 (1901) 1, 88 (1902) 299, 431; 90 (1902) 1, sowie Cohnstein und Michaelis, Ebenda 65 (1897) 473; 69 (1897) 76; Spiro-Ashers Ergebn. d. Physiol. 3 (1904) 1.

⁵⁾ Eberle, Physiologie der Verdauung, Würzburg 1834; Claude Bernard. Ann. Chim. Phys. [3] 25 (1849) 474; Leçons physiol. exper. 2 (1856); Grützner, Pflügers Archiv 12 (1876) 295; Berthelot, zitiert nach Gamgee, Physiologische Chemie der Verdauung, übersetzt von Asher u. Beyer, 1897, S. 225; Glaes-

wie in der Galle¹⁾; doch ist beim Magensaft noch zweifelhaft, ein wie großer Anteil der lipolytischen Wirkung diesem selbst und nicht zurückgeflossenem, Pankreaslipase führendem Duodenalinhalt zufällt²⁾.

Ob sich auch im Blut echte fettspaltende Lipase findet, ist noch nicht mit absoluter Sicherheit festgestellt, doch ist nicht ersichtlich, wie sich die vorhandenen Tatsachen anders als durch die Annahme einer solchen interpretieren ließen.

ner, Zeitschr. f. physiol. Chem. **40** (1903) 465; Lombroso, Archivio per le scienze med. **28** (1904) Heft 1; Biochem. Zentralbl. **3** (1905) 166; Hofmeisters Beitr. **11** (1908) 81; Umber u. Brugsch, Archiv f. experim. Pathol. **55** (1906) 164; Brugsch, Zeitschr. f. experim. Pathol. **6** (1909) 326; Frassi, Verh. d. 11. Kongr. d. ital. Vereins f. Geburtshilfe u. Gynäkol. 1906; Biochem. Zentralbl. **5** (1905) 875; Rosenberg, Archiv f. d. ges. Physiol. **70** (1897) 371 und in Oppenheimers Handb. d. Biochem. **3** (Jena 1908) 1; Fleckseder, Archiv f. experim. Pathol. **59** (1908) 408; Terroine, Journ. Physiol. Pathol. gén. **13** (1911) 857; Morel u. Terroine, Compt. rend. Soc. Biol. **70** (1911) 114; Giganti, Arch. Farm. **11** (1911) 115; Biochem. Zentralbl. **13**, 503; Jansen, Arch. Farm. **13** (1912) 15 Biochem. Zentralbl. **14**, 366; Groß, Archiv f. klin. Medizin **108** (1912) 106.

⁶⁾ Marcet, The med. Times **18** (1858) 210; Cash, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1880) 323; Ogata, Ebenda (1881) 515; F. Müller, Zeitschr. f. klin. Medizin **12** (1887) 107; Klemperer u. Scheuerlen, Ebenda **15** (1890) 370; Volhard, Ebenda **42** (1900) 414; **43** (1901) 397; Stade, Hofmeisters Beitr. **3** (1902) 291; Zinsser, Ebenda **7** (1905) 31; Fromme, Ebenda **7** (1905) 51; Haeren, Bull. Soc. Royal des scienc. méd. et nat. de Bruxelles (1906) 164; Biochem. Zentralbl. **5**, 1496; v. Pesthy, Boas' Archiv f. Verdauung **12** (1906) 292; Biochem. Zeitschr. **34** (1911) 147; Bickel, Deutsche med. Wochenschr. **32** (1906) 1323; v. Aldor, Wiener klin. Wochenschr. **19** (1906) Nr. 30; Sedgwick, Jahrb. f. Kinderheilk. **64** (1906), Ergänzungsheft, S. 194; Falloise, Arch. int. Physiol. **3** (1906) 396, **4** (1906) 87; Boldyreff, Archiv f. d. ges. Physiol. **121** (1907) 13; Zeitschr. f. physiol. Chemie **50** (1907) 394; van Herwerden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **56** (1908) 483; Finizio, La Pediatria **17**, 1; Biochem. Zentralbl. **12**, 1633; Ibrahim u. Kopec, Zeitschr. f. Biol. **53** (1909) 201; Davidssohn, Biochem. Zeitschr. **45** (1912) 284.

⁷⁾ Knauthe, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1898) 149; Frouin, Soc. Biol. **61** (1906) 665; Umber u. Brugsch, Archiv f. experim. Pathol. **55** (1906) 164; Kalaboukoff u. Terroine, Soc. Biol. **63** (1907) 617; Boldyreff, Zeitschrift f. physiol. Chem. **50** (1907) 394; Camus u. Nieloux, Compt. rend. Soc. Biol. **68** (1910) 619; Jansen, Zeitschr. f. physiol. Chem. **68** (1910) 400; Wakabayashi u. Wohlgemuth, Internat. Beitr. z. Pathol. d. Ernährung **2** (1912) Heft 4.

¹⁾ Bonano, Arch. Farm. **7**, Heft 10; Biochem. Zentralbl. **8** (1909) 755.

²⁾ Siehe Heinsheimer, Deutsche med. Wochenschr. **32** (1906) 1194; Laqueur, Hofmeisters Beitr. **8** (1906) 281; Levites, Zeitschr. f. physiol. Chem. **49** (1906) 273; London, Ebenda **50** (1907) 125; London u. Wersilowa, Ebenda **56** (1908) 545. Weitere Literatur über die Lipasen des Verdauungstraktus im Abschnitt Lipasen in Oppenheimer, Fermente, Leipzig 1913, Bd. 1.

Abgesehen von positiven Angaben französischer Autoren ¹⁾, bei welchen, infolge der Verwendung von Monobutyryn als Objekt der Spaltung, Unsicherheit darüber besteht, ob es sich um Lipase selbst oder um die früher als ein Fermentindividuum für sich angenommene, nur auf einfachere Ester eingestellte Monobutyrynase handelt, hat Hanriot ²⁾ die Gegenreaktion, die Esterifizierung des Glycerins mittels verschiedener Fettsäuren unter dem Einfluß der Blutlipase nachgewiesen, und hier kann es sich nicht um eine Verwechslung mit einer besonderen Monobutyrynase handeln, da dieselbe, wenn sie von der Lipase verschieden wäre, nicht auf die Fettspaltung und folglich auch nicht auf die Resynthese der Fette aus ihren Komponenten einwirken würde. Aber auch andere Gründe sprechen für das Vorhandensein eines echten lipolytischen Blutenzyms; doch kommt diese Wirkung vielleicht nur unter gewissen Bedingungen in nennenswertem Maße zur Geltung, wenn bestimmte Aktivatoren der Lipase in Funktion treten, so daß lipolytische Wirkungen, die an und für sich zu schwach sind um wahrgenommen zu werden, über die Empfindlichkeitsgrenze hinauf-rücken. Mit dieser Auffassung stimmt überein, daß Rona und Michaelis ³⁾ dank der großen Empfindlichkeit ihrer Methode auch Spaltung eines Neutralfettes (des Tributyrins) nachweisen konnten, und zwar hier wie bei der Organlipase [die außer beim Muskel, Gehirn ⁴⁾ und im Unterhautzellgewebe ⁵⁾ in allen Organen zu finden war] ⁶⁾ parallel-

¹⁾ Hanriot, Soc. Biol. 48 (1896) 925; Compt. rend. 123 (1896) 753; Hanriot u. Camus, Ebenda 124 (1897) 235; siehe ferner im folgenden.

²⁾ Hanriot, Compt. rend. 132 (1901) 212; 146 (1903) 212.

³⁾ Rona u. Michaelis. Biochem. Zeitschr. 31 (1911) 345; siehe ferner Izar. Ebenda 40 (1912) 390.

⁴⁾ Rona, Biochem. Zeitschr. 32 (1911) 482. Doch haben Wroblewski. Compt. rend. 152 (1911) 1334 und Pagenstecher, Biochem. Zeitschr. 18 (1908) 285, auch im Gehirn, wie dies eigentlich zu erwarten ist, Lipase gefunden.

⁵⁾ Berzeller, Biochem. Zeitschr. 44 (1912) 185.

⁶⁾ Ueber den Lipasegehalt der verschiedenen Organe variieren die Angaben wohl zum Teil wegen der ungleichen Tierarten, die untersucht wurden. So fand Svedenberg, Biochem. Zeitschr. 45 (1912) 467, beim Kaninchen die höchsten Werte für die Leber, danach in absteigender Reihenfolge Milz, Muskel, Lunge und Lymphdrüsen, während Juschtschenko, Ebenda 25 (1910) 49, für die Organe des Hundes die Reihe Pankreasdrüse, Leber, Milz, Hoden und Thyreoidca, und Pagenstecher (loc. cit.) die höchsten Werte (gemessen an der Säurezunahme von Olivenöl) für die Milz, danach für Leber, Niere, Lunge, Hirn und Fleisch feststellte. Siehe des weiteren über Organlipasen Loevenhart, Amer. Journ. Physiol. 6 (1902) 331; Bénech u. Guyot, Compt. rend. Soc. Biol. 55 (1903) 994; Bitnii-Schljachto, Zur Lehre von der Lipase, Inaug.-Dissert. St. Petersburg 1904; Biochem. Zentralbl. 3, 32; Ramond,

gehend der größeren oder geringeren Spaltung des Monobutyryns. Aber auch ohne besondere Kautelen gelingt der Nachweis der Blutlipase in Gegenwart bestimmter Aktivatoren, wie dies Pighini¹⁾ an Geisteskrankenblut festgestellt hat, welches in Gegenwart von Mangansulfat Lezithin spaltet, während die Zerebrospinalflüssigkeit keine lipolytische Wirkung zeigte²⁾.

Als Aktivator der spaltenden, jedoch merkwürdigerweise nicht der synthetisierenden Funktion³⁾ der Lipase kommt in erster Linie die Galle⁴⁾ in Betracht, resp. deren wirksame Bestandteile Glyko- und Taurocholsäure⁵⁾, sowie deren Salze in der optimalen Konzentration von ca. 0,1 %⁶⁾. Gerade diese Aktivatoren par excellence, von welchen man nach den Untersuchungen von Lintwarew⁷⁾, Babkin⁸⁾ und Donath⁹⁾ annehmen muß, daß sie eine Zymogenform der Lipase¹⁰⁾

Biol. 57 (1904) 342, 462; Fossati, XI. Kongr. Ital. Gynaek., 1906; Biochem. Zentralbl. 5 (1906) 876; Nadina Sieber, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55 (1908) 177; Mandel u. Leavenworth, Amer. Journ. Physiol. 21 (1908) 95; Fiesinger u. Marie, Compt. rend. Soc. Biol. 67 (1909) 107; Pennington u. Hepburn, U. St. Dep. agricult. Bureau Chem. circul. (1911) Nr. 75; Biochem. Zentralbl. 13, 156.

¹⁾ Pighini, Biochem. Zeitschr. 33 (1911) 190; siehe ferner Derselbe Ebenda 42 (1912) 443.

²⁾ Für die Zerebrospinalflüssigkeit normaler Menschen hat auch Kafka, Mitteil. Hamburger Staatskrankenanstalten, 1912, nur einen minimalen Lipasegehalt festgestellt, bei progressiver Paralyse und Gehirnluen einen sehr beträchtlichen.

³⁾ Donath, Hofmeisters Beitr. 10 (1907) 390. Eine gegenteilige Angabe findet sich bei Hamsik, Zeitschr. f. physiol. Chem. 65 (1910) 232.

⁴⁾ Nencki, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharm. 20 (1886) 367; Rachford, Journ. Physiol. 17 (1891) 72; Knauthé, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1898) 149; Bruno, Archives scienc. biol. de St. Petersburg 7 (1899) 114; Segale, Zentralbl. f. physiol. Stoffw. 8 (1907) 294; Zuntz u. Ussow, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1900) 380; Brugsch, Zeitschr. f. klin. Medizin 58 (1906) 518. J. Kalabonkoff u. Terroine, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 63 (1907) 372, 617.

⁵⁾ Magnus, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48 (1906) 376; v. Fürth u. J. Schütz, Hofmeisters Beitr. 9 (1907) 28; Laqueur, Ebenda 8 (1906) 281; H. Donath, Ebenda 10 (1907) 390.

⁶⁾ Loevenhart u. Souder, Journ. Biol. Chem. 2 (1907) 415.

⁷⁾ Lintwarew, Ueber Fermente im Pankreassaft, Dissert., Petersburg 1902; Biochem. Zentralbl. 1 (1903) 201.

⁸⁾ Babkin, Biochem. Zentralbl. 3 (1905) 714.

⁹⁾ Donath, Hofmeisters Beitr. 10 (1907) 390.

¹⁰⁾ Auf die Lipase selbst sollen gallensaure Salze nicht wirken. Die gerade auf Grund des ungleichen Verhaltens gegenüber Galle behaupteten Unterschiede zwischen Lipasen verschiedener Herkunft könnten damit zusammenhängend möglicherweise auf das Vorhandensein von Lipase in aktivem Zustand oder in der Zymogenform zurückzuführen sein.

erst in das aktive Ferment überführen, fehlen aber normalerweise dem Blut.

(Daß sie anormalerweise in den Kreislauf gelangen können, ist dagegen bei Ikterus bekannt. Weniger bekannt sind andere pathologische Bedingungen, unter denen Gallensäuren im Blut auftreten. Vielleicht lassen sich die schon im *Allg. Teil*¹⁾ erwähnten, zueinander in offenkundiger Beziehung stehenden Beobachtungen hier heranziehen, daß einerseits in Gegenwart der Taurocholsäure Blutkörperchen und Pneumokokken der Zerstörung anheimfallen und daß andererseits die nach Pneumonie festgestellten Degenerationsformen der Erythrozyten den durch taurocholsaures Natrium hervorgerufenen analog sind.)

Dies legt den Gedanken nahe, daß die geringe lipolytische Wirkung des Blutes und die noch geringere des Serums²⁾, in welchem die wohl selbst zur Lipaseabgabe an das Blut befähigten Leukozyten³⁾ und Erythrozyten fehlen, daher rührt, daß diese Flüssigkeiten die Lipase im wesentlichen als Zymogen enthalten, während andererseits auf eine Beziehung der Lipolyse zu den roten Blutkörperchen die von Rosenheim und Shaw-Mackenzie⁴⁾ gefundene Lipaseaktivierung durch Digitonin, Saponin und sonstige hämolytisch wirkende Stoffe sowie ein Befund von Connstein⁵⁾ hindeuten würden, wonach bei Sauerstoffzufuhr ein Verschwinden von Fett beobachtet wird. Doch könnte es sich im letzteren Fall [da die Lipase selbst durch Oxydationsmittel⁶⁾ geschädigt wird und wenigstens für Phytolipasen durch Tanaka⁷⁾ eine schwere Angreifbarkeit oxydierter Öle nachgewiesen worden ist] lediglich um eine Beschleunigung der Lipolyse, verursacht durch die oxydative Entfernung hemmender Spaltprodukte⁸⁾ der Reaktion handeln.

¹⁾ Allg. Teil S. 531, Fußnote 2.

²⁾ Daß Blut stärker lipolytisch wirkt als Serum, zeigen die übereinstimmenden Befunde von Doyon u. Morel, *Compt. rend. Soc. Biol.* 58 (1905) 616, so wie Rona u. Michaelis, *Biochem. Zeitschr.* 31 (1911) 345; über Esterspaltung im Blut siehe Rona. *Ebenda* 33 (1911) 413.

³⁾ Ueber Leukozyten (Lymphozyten)lipase siehe Fiessinger u. Marie, *Compt. rend. Soc. Biol.* 67 (1909) 177; Morris u. Boggs, *Arch. Int. Med.* 8 (1911) 806; Bergel, *Münchener med. Wochenschr.* (1909) 64, (1912) 634; *Deutsches Archiv f. klin. Med.* 106, 47; *Zeitschr. f. Immunitätsforsch.* 13 (1912) 255.

⁴⁾ Rosenheim u. Shaw-Mackenzie, *Journ. Physiol.* 40 (1910) VIII.

⁵⁾ Connstein, *Archiv f. d. ges. Physiol.* 65 (1896) 473, 69 (1897) 76.

⁶⁾ Für Permanganat und Ozon wurde dies durch Kastel, *Public health and marine hosp. Serv. of the U. St. A. Hyg. Lab. Bull.* Nr. 26, festgestellt.

⁷⁾ Tanaka, *Journ. Coll. Engen. Tokio* 5 (1912) 152.

⁸⁾ Für Buttersäure und Oelsäure wurde die Hemmung durch Terroine (*loc. cit.*) und Bradley, *Journ. Biol. Chem.* 6 (1909) 133, festgestellt. Beim Glycerin wird die hemmende Wirkung überkompensiert durch Reaktionsbegünstigung infolge Oberflächenvergrößerung, dies jedoch nur bei den Zoolipasen; bei Phytolipasen fand Tanaka, *Journ. Coll. Engen.* 5 (1912) 137, gerade umgekehrt einen hemmenden Einfluß.

Die beschleunigende Wirkung von Mangansalzen auf die Lipolyse, welche Neuberg und Reicher (loc. cit.) bei der lipolytischen Wirkung von Schlangengiften (Colubriden), Connstein (loc. cit.) bei Rizinuslipase, Magnus (loc. cit.) bei Pankreaslipase, Tanaka¹⁾ bei Phytolipasen, und Pighini²⁾, wie schon erwähnt, bei der Lipase im Blut von Geisteskranken beobachtet haben, würde auf einen ähnlichen Vorgang zurückzuführen sein.

Analog wie bei der von Pekelharing³⁾ auf eine Ausfällung der Fettsäuren zurückgeführten Beschleunigung der lipolytischen Wirkung durch Neutralsalze der Alkali- und Erdalkalimetalle, würde also die beobachtete Reaktionsbeschleunigung auf die Aufhebung einer Hemmung nach dem Massenwirkungsgesetz hinauslaufen. In all diesen Fällen kommt die Abgabe eines lipolytischen Prinzips natürlich nicht in Frage.

Im Sinne der Auffassung von Pekelharing wäre wohl auch die von Rubner⁴⁾ beobachtete Steigerung der Fettspaltung durch Bodenbakterien bei Kalkzusatz auf die Ausfällung der gebildeten hemmenden Fettsäuren als Kalksalze zurückzuführen.

Allerdings fehlt es bei diesen Salzwirkungen nicht an widersprechenden Literaturangaben. Während Pottevin,⁵⁾ für Chlorkalzium, und Terroine für alle Neutralsalze Begünstigung in geringer Konzentration (Hemmung in stärkerer) feststellten, und Minami⁶⁾ die auch von ihm beobachtete Aktivierung dem Anion des Neutralsalzes zuschrieb, hat Hamsik⁷⁾ bei Nichtvorhandensein von Seifen immer einen hemmenden Einfluß der Neutralsalze konstatiert, und auch Tanaka (loc. cit.) hat bei Phytolipasen für Magnesium-, Kalzium- und Kupfersalze eine hemmende Wirkung aufgefunden.

Erwähnt sei auch, daß Mansfeld⁸⁾ angenommen hat, daß die Spaltung der Fette durch deren Bindung an Eiweißkörper, wodurch sich die Fettkörper der Extraktion mittels Petroläther entziehen, vorgetauscht wurde, und daß Berzeller⁹⁾ auf Grund seiner Beobachtung, daß nach Alkoholeinwirkung die fraglichen Fettstoffe, die er als Lipoide anspricht, wieder zum Vorschein kommen, überhaupt eine Lipolyse im Blut in Abrede stellte. Ob die von Pitini und di Piazza¹⁰⁾ bei der Einwirkung hämolytischer Substanzen, wie Pyro-

¹⁾ Tanaka, Journ. Coll. Engen. Tokio 5 (1912) 142.

²⁾ Pighini, Biochem. Zeitschr. 33 (1911) 190.

³⁾ Pekelharing, Zeitschr. f. physiol. Chem. 81 (1912) 355.

⁴⁾ Rubner, Archiv f. Hygiene 38 (1900) 67.

⁵⁾ Pottevin, Compt. rend. 136 (1903) 1152, 138 (1904) 378; Ann. Inst. Pasteur 20 (1906) 901.

⁶⁾ Minami, Biochem. Zeitschr. 39 (1912) 392.

⁷⁾ Hamsik, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71 (1911) 238.

⁸⁾ Mansfeld, Zentralbl. f. Physiol. 21 (1907) 666.

⁹⁾ Berzeller, Biochem. Zeitschr. 44 (1912) 193.

¹⁰⁾ Pitini u. di Piazza, Arch. internat. da Pharmacodynam. 16, 290; Biochem. Zentralbl. 6, 1969.

gallol und Phenylhydrazin beobachtete Herabsetzung der lipolytischen Funktionen der Leber vielleicht darauf zurückzuführen wäre, daß die Blutkörperchenzerstörung ein vermehrtes Freiwerden von Lipasen, damit aber eine Erhöhung der lipolytischen Fähigkeiten des Blutes¹⁾ und eine Entlastung der Leber in bezug auf die vom Organismus zu leistende lipolytische Arbeit bedingt, ist auch eine der hier aufzuwerfenden Fragen.

Ein vikariierendes Eintreten von Blut- und Leberlipase könnte man auch vermuten auf Grund der von denselben Forschern gefundenen Steigerung der lipolytischen Funktionen der Leber durch Schilddrüsenexstirpation, welcher Eingriff im Gegensatz zu der Beeinflussung der Leberlipase nach Juschtschenko²⁾ die lipolytischen Wirkungen im Blut vermindert.

Ob außer den Cholsäuren und den übrigen in Betracht kommenden, im vorigen genannten Beschleunigern der Lipasewirkung, wie dies zuerst Hewlett³⁾ vermutet hat, auch das Lezithin als Aktivator der Lipasen fungiert — was gerade für die Aktivierung der Blutlipase von Bedeutung wäre — ist eine Frage, die schon im allgemeinen Teil gestreift worden ist. Die widersprechenden Angaben von Kalaboukoff und Terroine⁴⁾ einerseits, Küttner⁵⁾, Loevenhart und Souder⁶⁾ andererseits lassen den Einfluß bei der Lipase als kompliziert und vielleicht nur bei hohen Lezithinkonzentrationen wahrnehmbar erscheinen. Es mag dies vor allem damit in Zusammenhang stehen, daß das Lezithin selbst durch die Lipase gespalten wird, wie dies eingehend im folgenden besprochen ist. Es lagern sich daher hier ganz verschiedene Wirkungen übereinander.

Mit Sicherheit ist dagegen eine mit der Bildung einer wirkameren Verbindung mit dem Lezithin zusammenhängende Begünstigung durch Lezithin bei den Hämolysinen festgestellt worden. Diese letzteren können aber bei dem heutigen Stand der Forschung als wesentlich gleich mit den Lipasen betrachtet werden. Denn wie Friedemann⁷⁾,

¹⁾ Auf ein solches Freiwerden von Lipasen aus zerfallenden Erythrozyten wäre möglicherweise auch der von Abderhalden (loc. cit. im Abschnitt über die Abwehrfermente) beobachtete Organabbau durch Normalserum bei nicht völliger Blutfreiheit der Organe zurückzuführen.

²⁾ loc. cit. im folgenden, S. 470.

³⁾ Hewlett, John Hopkins Hosp. Bull. 16 (1906); zitiert nach Fürth u. Schütz, loc. cit. Fußnote 5, Seite 461.

⁴⁾ Kalaboukoff u. Terroine, Soc. Biol. 63 (1907) 372; Terroine, Ebenda 68 (1910) 439, 518, 666, 754.

⁵⁾ Küttner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50 (1907) 472.

⁶⁾ Loevenhart u. Souder, Journ. Biol. Chem. 2 (1907) 415.

⁷⁾ Friedemann, Deutsche med. Wochenschr. 33 (1907) 585.

Neuberg und Reicher¹⁾ sowie Wohlgemuth²⁾ und Bergel (loc. cit.) gezeigt haben, gehen die lipolytischen Wirkungen der Pankreas- und Gastrolipase, der lipolytischen Enzyme von Staphylokokken und Choleravibrionen, von Schlangengiften³⁾, sowie diejenigen von Immunseris den hämolytischen Eigenschaften derselben parallel. Die spaltende Wirkung, welche die Lipasen nicht allein gegenüber den gewöhnlichen Neutralfetten, sondern auch gegenüber den komplizierten Lipoidstoffen Lecithin, Protagon und Jekurin äußern⁴⁾ (und die auch Kyes bei der Lecithinbildung des Kobalysins⁵⁾ durch den Nachweis einer Fettsäure festgestellt hat), zerstört die lipoide Hülle der Blutkörperchen oder bringt an derselben wenigstens solche Änderungen hervor, daß sie für den Blutfarbstoff durchlässig wird.

Wir sind damit auf eine sehr interessante Beziehung der lipolytischen Agenzien zur Immunitätswissenschaft gestoßen. Denn nicht nur spielen spezifische Hämolsine die bei der Komplementbindungsreaktion erwähnte Nebenrolle, sondern es können normale und spezifische Lipasen auch selbständig als bakteriolytisches Agens fungieren. Sie stellen Abwehrfermente dar gegenüber den Tuberkelbazillen, den Leprabazillen, den malignen Tumoren. Die von Abderhalden und Rona⁶⁾ bei Fütterung mit großen Mengen Fett beobachtete Bildung von Abwehrfermenten gegen Fette im Blut (also Lipasen) läßt daran denken, in dieser Fermentbildung einen der Heilfaktoren, der gerade bei der Sanatoriumsbehandlung der Tuberkulose üblichen

¹⁾ Neuberg u. Reicher, Münchener med. Wochenschr. 54 (1907) Nr. 35; Biochem. Zeitschr. 4 (1907) 281; 11 (1908) 400.

²⁾ Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 4 (1907) 271.

³⁾ Manwaring, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 6 (1910) 513, sowie schon Neuberg und Rosenberg (loc. cit.) zeigten, daß es sich um die Abspaltung von Fettsäure aus Lipoiden handle.

⁴⁾ Bokay, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1 (1877) 157; Fr. Müller, 20 Kongreß f. innere Medizin, Wiesbaden 1902; Verhandl. d. naturforsch. Ges. Basel 13, 308; Wohlgemuth, Ebenda 44 (1905) 540; Biochem. Zeitschr. 39 (1912) 302; Schumoff-Simanowski u. Sieber, Zeitschr. f. physiol. Chem. 49 (1906) 50; siehe auch Kutscher u. Lohmann, Ebenda 39 (1903) 159; Waldvogel, Ebenda 42 (1904) 200; Sieber, Ebenda 72 (1911) 463; Coriat, Amer. Journ. Physiol. 12 (1905) 353; P. Mayer, Biochem. Zeitschr. 1 (1906) 39; Neuberg u. Rosenberg, Berliner klin. Wochenschr. 54 (1907) 54; Clémenti, Arch. Fisiol. 8 (1910) 399; Usuki, Archiv f. experim. Pathol. 63 (1910) 270; Brugsch u. Masuda, Zeitschr. f. experim. Pathol. 8 (1911) 617; sowie Kalaboukoff u. Terroine, Compt. rend. Soc. Biol. 66 (1909) 176; vgl. damit die einzigen gegenteiligen Angaben von Stassano u. Billon, Soc. Biol. 55 (1903) 482.

⁵⁾ Siehe darüber S. 534 u. 535 des *Allg. Teils*.

⁶⁾ Abderhalden u. Rona, Zeitschr. f. physiol. Chem. 75 (1911) 30.

Ueberernährung, zu suchen, und umgekehrt in der durch Fettmangel gekennzeichneten Unterernährung als Folge der Hungerblockade eine der Ursachen des erschreckenden Anwachsens der Tuberkulose während und nach dem Krieg. Allerdings haben Abderhalden und Lampé¹⁾ auch im Hunger die Bildung von lipolytischen Abwehrfermenten beobachtet. Eine derartige Bildung von Abwehrfermenten gegen in die Blutbahn gelangendes Organfett im Hunger muß jedoch mit der Aufzehrung der Fette im Organismus ihr Ende erreichen, und dies bedeutet den Verlust einer wertvollen Waffe, die sich gegen die Fettsubstanzen der Tuberkelbazillenhüllen richtet. Die noch zu streifende Frage der Tuberkuloseprädisposition hängt daher vielleicht eng mit dem Lipasemangel zusammen.

Ganz allgemein kann neben einer proteolytischen eine lipolytische Komponente des lytischen Immunkörpers überall dort beobachtet werden, wo der Erreger, an welchen sich der Immunkörper anzupassen hat, außer Eiweiß auch Fette in seiner Leibessubstanz besitzt.

Andererseits sind aber auch die pathogenen Bakterien, und zwar nach Sommaruga²⁾ sämtliche, zur Fettspaltung befähigt³⁾).

Die Wanderung des Tetanustoxins längs den Nervenbahnen zentralwärts könnte eine Folge dieser lipolytischen Wirkung sein. Denn Ausnahmen von dem Grahamschen Gesetz, daß Kolloide für andere Kolloide⁴⁾ undurchlässig sind, finden wir ja gerade dort, wo ein Enzym und sein Substrat in Frage kommen. Aus dem nämlichen

¹⁾ Abderhalden u. Lampé, Zeitschr. f. physiol. Chem. 78 (1912) 396.

²⁾ Sommaruga, Zeitschr. f. Hygiene 18 (1894) 441; siehe ferner Carrière, Compt. rend. Soc. Biol. 53 (1901) 320 (Tuberkelbazillenlipase); Pfersdorff, Zeitschr. f. Tiermedizin 8 (1904) Heft 1/2 (Lipase aus autolysierten Milzbrandbazillen), sowie Söhngen, Kon. Akad. van Wetensch. Amsterdam 19 (1910) 689, 20 (1911) 126.

³⁾ Doch besitzen auch nichtpathogene Bakterien bisweilen lipolytische Fähigkeiten [G. Schwartz u. H. Kayser, Zeitschr. f. klin. Medizin 56 (1905) Heft 1/2; Rubner, Archiv f. Hygiene 38 (1900) 67; Schreiber, Ebenda 41, 328; Krueger, Bakteriolog. Zentralbl. 7 (1890) 467; Jensen, Ebenda [2] 8 (1902) 11; Huß, Ebenda [2] 20 (1908) Heft 15—17; siehe ferner Fuhrmann, Bakterienenzyme, Jena 1907, und Kruse, Allg. Mikrobiologie, Leipzig 1909, S. 432].

⁴⁾ Daß die Theorie der Tetanuswirkung mit den Gesetzen der Kolloidchemie zu rechnen hat, zeigen die schlagenden Heilerfolge, welche Melzer durch Einspritzung von 25%iger Magnesiumsulfatlösung in den Lumbalsack erzielte und die auch in der chirurgischen Klinik der Universität Bern unter ihrem früheren Direktor Prof. Kocher zu einer Verdrängung des Tetanusserums durch das einfache Salz geführt hatten.

Grunde, sei es infolge einer stattfindenden Spaltung oder nur infolge der dieser vorausgehenden Bindung, Adsorption oder Lösung, dürfte sich das Toxin seinen Weg in der lipoidreichen Nervensubstanz bahnen, wie das Pepsin in die Tiefe koagulierter Eiweißsäulen zu dringen vermag. Zugleich wird die Deutung des Tetanustoxins als eines lipolytischen Prinzips durch zwei weitere Umstände nahegelegt:

Zunächst spricht für seine lipolytische bzw. hämolytische Natur die auch bei andern lipolytischen und hämolytischen Agenzien beobachtete Entgiftung durch das im Serum kreisende Cholesterin¹⁾.

Das Tetanustoxin entfaltet ferner — außer dem spastischen — einen hämolytischen Effekt. Diese Tatsache ist durch die Annahme zweier von den Tetanusbazillen abgesonderter Gifte, eines die Krämpfe bedingenden Tetanospasmins und eines die Blutkörperchen lösenden Tetanolysins, erklärt worden.

Die Auffassung, daß das Tetanustoxin den Charakter einer Lipase besitzt, läßt diese dualistische Theorie entbehrlich erscheinen; sie setzt die hier vorliegenden Verhältnisse in Parallele zu den vorhin genannten Befunden von Friedberg, Wohlgemuth, Neuberg und Reicher. Danach wäre also das Tetanustoxin einheitlich zu betrachten, die hämolytische wie die spastische Wirkung nichts anderes als Erscheinungsformen der Lipolyse, deren Ungleichheit einzig durch die Besonderheiten des Substrats — der roten Blutkörperchen und der Nervenzellen —, an dem die Lipoidspaltung gerade manifest geworden ist, vorgetäuscht wird. Beim Eindringen des Tetanustoxins in den Organismus kommt es zu einer Verteilung des spaltenden Prinzips auf diese beiden Substrate und der auf jedes Substrat entfallende Prozentsatz an Gift wird durch die Eigenart des Toxins der betreffenden Tetanuskultur, die Eigenart der in Frage kommenden Substrate²⁾ und damit durch die Geschwindigkeit ihrer Wechselwirkung, sowie zum Teil damit zusammenhängend, durch die zeitliche Differenz bestimmt, mit der Blutkörperchen und Nervensubstanz mit dem Gift in Berührung kommen. Je rascher die der Spaltung vorausgehende Bindung an die Blutkörperchenlipide vor sich geht, je mehr Blutkörperchen bei dem in einem bestimmten Fall gegebenen Abstand der Infektionsstelle von den Nervenendigungen, Gelegenheit finden den zeitlichen Vorsprung dieses Substrates auszunutzen, desto mehr überwiegt die hämolytische

¹⁾ Siehe Fußnote 2, S. 535 des *Allg. Teils*.

²⁾ Die Angriffsfähigkeit der Blutkörperchenlipide wie der Nervenlipide variiert von Tierart zu Tierart und zeigt bei Tieren derselben Art individuelle Unterschiede.

die spastische Wirkung. Umgekehrt wiegt die spastische Wirkung in solchen Fällen vor, wo sich die Wechselwirkung zwischen Blutkörperchenlipoiden und Tetanustoxin langsam vollzieht oder wo nur relativ wenig Blutkörperchen Gelegenheit finden mit dem Gift in Berührung zu treten, bevor es von der Nervensubstanz verankert wird.

Nicht allein Bakterien, sondern auch sonstige niedrige Lebewesen, so vor allem Saccharomyceten¹⁾, Schimmelpilze²⁾ und andere niedere und höhere Pilze³⁾, sind Träger von Lipasen, sowie ferner zahlreiche höhere Pflanzen⁴⁾. Bei den letztgenannten sind diese Fermente in den ruhenden und namentlich in den keimenden, ölführenden Samen von besonderer Bedeutung; doch kommen sie auch anderweitig vor⁵⁾. Nicht unmöglich ist es, daß die in manchen Fällen beobachtete Heilwirkung des von Schmidt aus Schimmelpilzen hergestellten Antimeristems bei malignen Tumoren, die schon Much mit dem Fermentgehalt der Schimmelpilze in Zusammenhang gebracht hat, auf der Gegenwart einer Pilzlipase beruht, die an die Stelle einer im Blut

¹⁾ Delbrück, Wochenschr. f. Branerei 20 (1903) 7, nahm an, daß das bei der alkoholischen Gärung entstehende Glycerin durch Spaltung des Hefefettes entsteht. Ueber die Herkunft des Glycerins siehe jedoch den Abschnitt „Zymasen“.

²⁾ Gérard, Compt. rend. 124 (1897) 370; Camus, Soc. Biol. 49 (1897) 192, 230; Garnier, Ebenda 55 (1903) 1490, 1543; Spieckermann u. Bremer, Landwirtsch. Jahrbücher 31 (1902) 81; Rouge, Bakteriolog. Zentralbl. [2] 18 (1907) 403, 587.

³⁾ Außer den an anderer Stelle besonders genannten siehe Borzi, Bot. Zentralbl. 24 (1885) 14; Biffen, Ann. Bot. 13 (1899) 163, 330; Laxa, Archiv f. Hygiene 41 (1902) 119; Deleano, Biochem. Zeitschr. 17 (1909) 225; Arch. d. scienc. biol. St. Petersburg 14, Heft 3.

⁴⁾ Siehe über das Vorkommen von Lipasen im Pflanzenreich außer den Literaturangaben im vorigen und folgenden in diesem Abschnitt: Lumia, Staz. sperim. Agrar. Ital. 31: 397; Malys Jahrb. (1898) 724; Fokin, Journ. d. russ. physik.-chem. Ges. 35, 1197; Biochem. Zentralbl. 2, 1702; Chem. Revue üb. d. Fett- u. Harzind. 11 (1904) 30, 48, 69, 91, 118, 139, 167, 193, 224, 244; Braun u. Behrendt, Ber. d. chem. Ges. 36 (1903) 1142, 1900; Braun, Ebenda 36 (1903) 3003; Bitnij-Schljachto, Arch. d. scienc. biol. St. Petersburg 11 (1905) 37; Dunlap u. Seymour, Journ. Amer. Chem. Soc. 27 (1905) 935; Scurti u. Parozzani, Gaz. chim. ital. 37 (1907) 476; Mastbaum, Chem. Zentralbl. (1907) I, 978; van den Driessen Marleuw, Pharm. Weekblad 46; Malys Jahrb. (1909) 885; Tonegutti, Stat. sperim. agrar. Ital. 43, 723; Malys Jahrb. (1910) 876; Gerber, Compt. rend. 152 (1911) 1611; siehe ferner Czapek, Biochemie der Pflanzen 1, Jena 1905, S. 129 ff.; Oppenheimer, Fermente, Bd. 1, 1913, S. 181—183; Connstein, Ergebn. d. Physiol. 3 (1904) 1.

⁵⁾ So fand Kammann, Biochem. Zeitschr. 46 (1912) 151, ein lipolytisches Prinzip in Roggenpollen.

Karzinomatöser fehlenden oder herabgesetzten tumorlösenden Substanz treten kann.

Vielleicht handelt es sich nicht um ein eigentliches Fehlen, sondern um eine Hemmung der spaltenden Funktion. Schon bei den Proteasen sind wir auf ein Antitrypsin im Blut Karzinomatöser gestoßen, welches für eine Hemmung des tryptischen Blutenzyms verantwortlich gemacht werden kann. In analoger Weise könnte sich auch gegen ein lipolytisches Enzym ein möglicherweise gleichfalls als Verdauungsprodukt auffaßbarer Antikörper bilden, welcher die von Pottevin¹⁾ u. a., z. B. bei der Synthese des Trioleins festgestellte Reversibilität der Lipasewirkung bedingt²⁾. Im Gegensatz zum Verhalten des Karzinomträgers haben Buxton u. Shaffer³⁾ in den Tumoren selbst Lipase aufgefunden, so daß die Tumoren also ebensowohl zur Aufspaltung der Fette eines Karzinomträgers wie zur Spaltung seiner Eiweißkörper befähigt sind⁴⁾.

In diesem Zusammenhang interessiert vor allem die von einer Reihe von Forschern⁵⁾ beobachtete und von Achard und Clerc⁶⁾ als prognostisch ungünstiges Zeichen gedeutete Herabsetzung des Blutlipasegehaltes bei Karzinom. Daß eine solche Verminderung bei anderen mit Kachexie einhergehenden Krankheiten, wie schwerer Tuberkulose, ebenfalls beobachtet werden kann und nach Melis-Schirru⁷⁾ auch in der Norm vorkommt, spricht nicht dagegen. Die Einschränkung für die diagnostische Praxis wird durch neue Einblicke in theoretischer Hinsicht aufgewogen. Der Lipasemangel bei manchen Individuen könnte, trotzdem dieselben noch gesund sind, von einer Prädisposition

¹⁾ Pottevin, Compt. rend. 136 (1903) 1152, 138 (1904) 378; Ann. Inst. Pasteur 20 (1906) 901 (siehe weitere Literatur über reversible Lipasewirkung im folgenden sowie im *Allg. Teil*, letztes Kapitel).

²⁾ Vergl. die von Schütze, Deutsche med. Wochenschr. 30 (1904) Heft 9 u. 10; Bertarelli, Zentralbl. f. Bakteriologie. 40 (1905) 231, und Braun, Chem.-Ztg. 29 (1905) 34, durch Immunisierung von Kaninchen mit Rizinuslipase erhaltenen Antikörper.

³⁾ Buxton und Shaffer, Journ. Med. Research 9, 356, 13 (1904) 543.*

⁴⁾ Siehe über proteolytische und peptolytische Tumorenzyme: Abderhalden, Zeitschr. f. Krebsforschung 9 (1910) Heft 2; Archiv f. wissenschaftl. u. prakt. Tierheilkunde 36 (1910) 1; Abderhalden u. Rona, Zeitschr. f. physiol. Chem. 60 (1909) 411; Abderhalden, Kölker u. Medigreceanu, Ebenda 62 (1909) 145; Abderhalden u. Medigreceanu, Ebenda 66 (1910) 265; Abderhalden u. Pincussohn, Ebenda 66 (1910) 277; Abderhalden, Pincussohn u. Ad. Walther, Ebenda 68 (1910) 471.

⁵⁾ Carrière, Compt. rend. Soc. Biol. 51 (1899) 989; Garnier, Ebenda 55 (1903) 1423; Achard u. Clerc, Arch. de Méd. experim. 14 (1905) 809; J. Bauer, Wiener klin. Wochenschr. 25 (1912) 376.

⁶⁾ Achard u. Clerc, loc. cit. vorige Fußnote.

⁷⁾ Melis-Schirru, Klin. Med. Ital. 45 (1908) Nr. 6; Biochem. Zentralbl. 7 (1907).

für Karzinom oder Phtise begleitet sein. Gerade bei Phtise wäre eine solche Prädisposition infolge Lipasemangels um so leichter verständlich, als die Tuberkelbazillen Hüllen besitzen, an deren Aufbau ein hochmolekulares Fett ausschließlich oder doch wesentlich beteiligt ist.

Auch andere Beziehungen des Lipasemangels zu Krankheitszuständen sind vermutet worden. So hat Melis-Schirru (loc. cit.) eine Beziehung des Blutlipasegehaltes zu Erkrankungen des Lymphsystems und eine diagnostische Verwertbarkeit auf dieser Grundlage für wahrscheinlich gehalten. So hat ferner Juschtschenko¹⁾ eine allerdings von v. Heß²⁾ bestrittene Abnahme des Lipasegehaltes im Blut bei Schilddrüsenexstirpation beobachtet, während bei Hypersekretion dieser Drüse umgekehrt eine Steigerung der lipolytischen Fähigkeiten des Blutes stattfinden würde, eine Beobachtung, die, wenn sie den Tatsachen entspricht, sehr wichtig für die Diagnose der Hyposekretion wie der Hypersekretion (Basedow) der Schilddrüse sein könnte. Da bei Hypersekretion der Schilddrüse in vermehrtem Maße bestimmte Stoffe an das Blut abgegeben werden, welche die innere Sekretion der Pankreasdrüse hemmen, so ließe sich hieraus vielleicht auch die bei manchen Diabetesfällen beobachtete (Garnier) Erhöhung des Lipasegehaltes im Blut erklären, die ihrerseits auch mit dem Fettreichtum des Diabetikerblutes im Zusammenhang stehen muß. Es wären dies wohl Fälle von sekundärem Pankreasdiabetes infolge einer Hypersekretion der Schilddrüse (vgl. die Ausführungen an anderer Stelle). Winternitz und Meloy³⁾ haben allerdings bei Diabetes Verminderung der Lipase konstatiert. Ihre Angaben beziehen sich jedoch auf Gewebslipasen und könnten insofern mit einem vermehrten Lipasegehalt des Diabetikerblutes in Zusammenhang gebracht werden, als gerade durch Krankheit geschwächte Organe eher ihrer Zellfermente verlustig gehen dürften als gesunde. Die Zellfermente würden dann zunächst in diesem Fall vom Blut aufgenommen und erst in der Folge bei erheblicher Erhöhung der Blutlipase, so bei Pankreasschädigungen⁴⁾ (vgl. die Lipaseuntersuchung im Blut bei Diabetes), bei Fieber und Leukozytenzerfall, oder unter besonderen Bedingungen, wie bei Nierenläsionen⁵⁾ oder bei Polyurien⁶⁾, in den

¹⁾ Juschtschenko, Biochem. Zeitschr. 25 (1910) 49.

²⁾ v. Heß, Journ. Biol. Chem. 10 (1911) 38.

³⁾ Winternitz u. Meloy, Journ. Med. Research 22 (1910) 107.

⁴⁾ Hewlett, Journ. Med. Research 11 (1904) 377.

⁵⁾ Zeri, Il Policlinico 12 (1905); Sezione pratic. Biochem. Zentralbl. 4, (1905/06) 1500; Loeper u. Ficaï, Compt. rend. Soc. Biol. 62 (1907) 1018, 1033.

⁶⁾ Pribram u. Löwy, Zeitschr. f. physiol. Chem. 76 (1912) 489.

Harn übergehen, dem sie normalerweise fehlen¹⁾. Des weiteren hat Samelsohn²⁾ die Lipaseverminderung im Blut mit der Säuglings-atrophie in Zusammenhang gebracht.

Die verschiedenen hier erwähnten Befunde führen wieder zurück auf die Frage, ob im Blut eine echte Lipase vorhanden ist oder nicht. Nach den früheren Ausführungen über die Erzeugung spezifischer, im übrigen jedoch mit den Lipasen prinzipiell übereinstimmender Hämolyse durch die Einspritzung roter Blutkörperchen einer fremden Art muß dies entschieden bejaht werden. Für das Normalserum könnte man vielleicht den früher genannten tumorlösenden, bei 55° zugrunde gehenden, mit Äther extrahierbaren Stoff mit der Blutlipase in Beziehung bringen; doch kann man diese Substanz mit dem gleichen Recht auch für die Blutprotease in Anspruch nehmen. Eine Entscheidung hierüber zu treffen, ist bei dem gegenwärtigen Stand der Dinge und vielleicht auch der Natur der Sache nach nicht möglich. Denn es könnte dieser lytische Stoff Träger der proteolytischen sowohl als der lipolytischen Fähigkeiten des Blutes sein; vielleicht ist er nichts anderes als das „Komplement“ für die eine sowohl als für die andere Funktion.

Für die Komplementnatur würde die Tatsache sprechen, daß seine Inaktivierungstemperatur (55°) genau übereinstimmt mit derjenigen des lytischen — und zwar sowohl des bakteriolytischen als des hämolytischen — Immunkörpers, während das Komplement der pankreatischen Lipase der etwas höheren Temperatur von 62° zur Inaktivierung bedarf.

Es ist diese Übereinstimmung um so bemerkenswerter, als die Tötungstemperatur auch anderer gewöhnlicher Lipasen nach den Angaben von Terroine³⁾, Slosse u. Limbosch⁴⁾, bei nur 55° liegt. Immerhin kommen starke Abweichungen in der Temperaturresistenz nach unten und oben vor. Ja es soll sogar nach Visco⁵⁾ schon bei 41° eine Schädigung zu konstatieren sein, wenn nicht das zu spaltende Substrat (Öl) zugegen ist, trotzdem diese Temperatur nach Slosse und Limbosch (loc. cit.) innerhalb der optimalen Temperaturgrenzen (36—50°) liegt. Phytolipasen besitzen eine wenn möglich noch größere Temperaturempfindlichkeit. Es ist zwar eine Wirkung bis eben über 60° beobachtet worden; die Optimaltemperatur liegt jedoch tiefer, und die Schädigungen machen sich oberhalb 35° sehr stark bemerkbar. Andererseits erhielt Söhnngen (l. c.) merkwürdigerweise aus *Bac. fluorescens*, *liquefaciens* und *pyocyaneus* eine thermostabile Lipase, die 5 Minuten langes Erhitzen auf 100° vertrug, dagegen schon durch geringe Säuremengen zerstört wurde.

¹⁾ Tanfani, *Gaz. degli Osped.* **31**, 1521; *Biochem. Zentralbl.* **11** (1911) 2598.

²⁾ Samelsohn, *Zeitschr. f. Kinderheilkunde* **4** (1912) 205.

³⁾ Terroine, *Biochemische Zeitschr.* **23** (1910) 404, 430.

⁴⁾ Slosse und Limbosch, *Arch. internat. Physiol.* **8** (1909) 432.

⁵⁾ Visco, *Arch. ital. Biol.* **54** (1911) 243.

Die Auffassung einer Identität des proteolytischen und lipolytischen Komplements läßt sich ferner nicht von der Hand weisen, wenn man die Verhältnisse bei der Komplementbindungsreaktion ins Auge faßt. Das Zustandekommen dieser Reaktion ist ja gerade an eine solche Identität geknüpft, an die Konkurrenz des lipolytischen bzw. hämolytischen und des bakteriolytischen Systems, welches letzteres bei der Mehrzahl der Bakterien als ein proteolytisches betrachtet werden muß.

Faßt man nun aber, entsprechend der Mehrzahl der Forscher, das Komplement als das die Verdauung beherrschende Hauptagens, als das eigentliche lytische Enzym auf, so muß daraus ein Schluß von größter Tragweite gezogen werden: **Die prinzipielle Gleichheit proteolytischer und lipolytischer Enzyme, das Vorhandensein eines generellen, Hydrolyse beschleunigenden Grundenzym.**

Variabel wäre nur der Ambozeptor, welcher danach nicht allein die feineren Differenzen der proteolytischen und lipolytischen Enzyme untereinander bedingen würde, sondern auch die groben Unterschiede zwischen den auf ganz heterogene Substrate eingestellten Enzymen.

Nach dieser Auffassung würde der Gehalt des Blutes an echter Lipase als ebenso selbstverständlich erscheinen, wie das Vorhandensein einer Blutprotease.

In diesem Zusammenhang rückt, nebenbei bemerkt, auch die Tatsache in eine neue Beleuchtung, daß die Magen- und Pankreaslipase nach Volhard und Stade¹⁾ sowie Engel²⁾ dem Schütz-Borissowschen Pepsingesetz folgen³⁾. D. h. also, bei gleicher Verdauungszeit verhalten sich die Verdauungsprodukte wie die Quadratwurzeln aus den Fermentquantitäten und bei gleichen Fermentmengen stehen, wie es das Zeitgesetz verlangt, die Verdauungsprodukte zueinander im Verhältnis der Quadratwurzeln aus den Verdauungszeiten⁴⁾.

¹⁾ Volhard, Zeitschr. f. klin. Medizin 62 u. 63; Stade, Hofmeisters Beitr. 3 (1902) 291; siehe auch über das Fermentgesetz der Magenlipase Bénech u. Guyot, Soc. Biol. 55 (1903) 719, 721, 994.

²⁾ Engel, Hofmeisters Beitr. 7 (1905) 77; siehe auch die Bestätigung der Gültigkeit des Fermentgesetzes bei der Pankreaslipase: Kanitz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46 (1905) 482.

³⁾ Bei höheren Enzymkonzentrationen verliert das Gesetz seine Gültigkeit.

⁴⁾ Herzog, in Oppenheimer, Fermente, Bd. 2, 1913, S. 1021, 1022, fand bei Berechnung von Versuchen von Kastle u. Loevenhart, Amer. Chem. Journ. 24 (1900) 491, ebenfalls die Beziehung:

$$\sqrt{\frac{x}{t}} = k.$$

Die Menge der Verdauungsprodukte ergibt sich demnach zu $p = k \sqrt{F \cdot t}$, wenn F die Fermentmenge, t die Verdauungszeit, p die Verdauungsprodukte und k eine Konstante bedeutet; doch gilt diese Gesetzmäßigkeit im allgemeinen nur für die Lipasen des Tierreiches und in ähnlichen Grenzen, wie dies beim Pepsin erörtert worden ist¹⁾. Immerhin kann für die Rizinuslipase nach Falk und Nelson²⁾ wenigstens das Zeitgesetz — wonach also der Umsatz der Quadratwurzel aus der Verdauungszeit proportional ist — Gültigkeit beanspruchen, und ähnliches fand Jalander³⁾ im System Triolein + wenig verdünnte Essigsäure. Der durch trockene Rizinuslipase bedingte Umsatz, welcher sich durch die Formel $\frac{x}{t^m}$ in ziemlich weiten Grenzen

darstellen ließ, folgte der Schützschens Regel, da m angenähert $= \frac{1}{2}$ (0,5—0,7) gesetzt werden kann. Es gilt dies jedoch nicht für das erste und letzte Viertel der Verdauung. Bei geringen Lipasemengen wurde bei kurzer Verdauungszeit vielmehr Proportionalität mit der Enzymquantität festgestellt.

Für andere Phytolipasen scheinen die Verhältnisse komplizierter zu liegen.

So fand Zellner⁴⁾, bzw. nach Berechnung von dessen Versuchsergebnissen, Kanitz bei der Lipase des Fliegenschwamms zweimal

$\frac{x}{t}$ und einmal $\frac{x}{\sqrt{t}}$ konstant und Rouge⁵⁾ erhielt bei verdünnten

Lösungen der Lipase von *Lactarius sanguifluus* direkte Proportionalität zwischen Enzymmenge und Enzymwirkung.

Nach Connstein, Hoyer und Wartenberg⁶⁾ besteht eine wesentliche Eigenart der Phytolipasen⁷⁾ in der beträchtlichen Säuremenge⁸⁾, welche diese gleich dem Pepsin zu ihrer Aktivierung be-

¹⁾ Siehe Arrhenius, *Immunochemie*, 1907, S. 82.

²⁾ Falk u. Nelson, *Journ. Amer. Chem. Soc.* 34 (1912) 735.

³⁾ Jalander, *Biochem. Zeitschr.* 36 (1911) 435.

⁴⁾ Zellner, *Monatsh. f. Chem.* 26 (1905) und 27 (1906) 295; siehe auch Derselbe, *Chemie der höheren Pilze*, Leipzig 1907.

⁵⁾ Rouge, *Bakteriol. Zentralbl.* [2] 18 (1907) 403, 587.

⁶⁾ Connstein, Hoyer u. Wartenberg, *Ber. d. chem. Ges.* 35 (1903) 3988.

⁷⁾ Doch gilt hier nach der Berechnung von Kanitz noch die Beziehung:

$$\frac{p}{\sqrt{t}} = k.$$

⁸⁾ Ueber die Wirkung der Rizinuslipase in Gegenwart verschiedener organischer Säuren siehe Armstrong u. Ormerod, *Proc. Royal Soc. London* 78.

dürfen. Es ist deren Wirksamkeit nach Henri und Nicloux¹⁾ sowie Tanaka²⁾ proportional der absoluten Säuremenge.

Da nun aber durch den Spaltprozeß selbst aktivierende Säure in Freiheit gesetzt wird, so ist es klar, daß das autokatalytische Moment als komplizierender Faktor hineinspielt.

Sehr schön tritt nach den erwähnten Forschern die Autokatalyse zutage, wenn man nach Sigmunds Vorschrift³⁾ pulverisierte Rizinussamen mit Wasser zerreibt und 24 Stunden bei 40° beläßt. Nach dieser Zeit lassen sich die ersten geringen Säuremengen titrimetrisch nachweisen, und nach einigen Tagen weicht das ganz allmähliche Anwachsen der Säuremenge einem rapiden Anstieg, entsprechend dem Einsetzen der Lipasewirkung, wenn die Säure bis zur aktivierenden Konzentration zugenommen hat. Auch bei dem mit Selbstgärung einhergehenden Prozeß der Rizinusölspaltung bei der Methode der „Fermentmilch“-Darstellung nach Hoyer (loc. cit.) dürfte es sich um eine Autokatalyse handeln, wobei die Reaktion durch die minimsten Spuren freier Säure, die für sich allein durch Hydrolyse des Rizinusöls entstehen (oder auch eventuell Säurespuren anderer Herkunft), eingeleitet werden kann. Jede auch noch so geringe Zymogenmenge, die durch solche Säurespuren in aktive Lipase übergeführt wird, ist Ursache einer erneuten Säurebildung durch lipolytische Spaltung des vorhandenen Rizinusöls, und die Säurevermehrung zieht die weitere Ueberführung von Zymogen in Lipase nach sich, vermehrt mit der Bildung des Ferments wiederum die Oelspaltung und damit die vorhandene Säure usw. Es findet somit eine beständige Zunahme der lipolytischen Spaltung des vorhandenen Oeles statt, vorausgesetzt, daß der von Sörensen auf Grund der Versuche von Jalander⁴⁾ zu 10^{-3} berechnete Optimalwert für die Wasserstoffionenkonzentration der Rizinuslipase nicht überschritten wird, eine Voraussetzung, die hier wie bei anderen Spontanaktivierungen des Lipasezymogens, z. B. bei der Samenkeimung⁵⁾ zutrifft. Bei der natürlichen Samenkeimung ist nach Hoyer⁶⁾ Milchsäure der Aktivator. Dieselbe Bedeutung besitzen die in aktivierenden Samenextrakten enthaltenen einfachen Aminosäuren und die daraus hervorgegangenen Polypeptide (Albumosen).

Weitere Unterschiede zwischen den Lipasen des Verdauungskanalns und den Phytolipasen bestehen in der fehlenden Anpassung der letzteren an einfache Säureester, z. B. Buttersäureäthyl- und

¹⁾ Henri u. Nicloux, Soc. Biol. 57 (1904) 175; siehe ferner die Arbeiten von Nicloux, Ebenda 54 (1902) 840, 56 (1904) 701, 702, 839, 840 868, 57 (1904) 84, 175.

²⁾ Tanaka, Journ. Coll. Ingen. Tokyo 5 (1912) 125.

³⁾ Sigmund, Wiener Monatsh. 11 (1890) 272.

⁴⁾ Jalander, Biochem. Zeitschr. 36 (1912) 435.

⁵⁾ Siehe hierüber Mulder, Chemie des Bieres, S. 222, der Uebersetzung von Grimm; Sachs, Botan. Zeitschr. (1859) 178, (1862) 242; Pelouze, Ann. Chim. phys. [3] 45, 319; Fleury, Ann. Chim. [4] 4 (1865) 38; Müntz, Ebenda [4] 22 (1871) 472; Schützenberger, Internat. wissenschaftl. Bibliothek (1876) 263; Green, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 48 (1890) 370, (1906) 378.

⁶⁾ Hoyer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50 (1907) 414.

Mandelsäureäthylester, welche sie im Gegensatz zu den Zoolipasen nicht zu spalten vermögen¹⁾, sowie in der mangelnden Aktivierbarkeit durch Galle²⁾. Das Verhalten gegenüber Galle ist wohl als eine Anpassungserscheinung zu betrachten, richtet sich doch auch bei den Zoolipasen die Aktivierbarkeit durch Glyko- und Taurocholsäure danach, ob das Ferment an seiner natürlichen Wirkungsstätte normalerweise mit Galle in Berührung kommt.

Nur bei der Pankreaslipase finden wir daher starke Aktivierung durch Galle; im Darmsaft ist die Verstärkung schon bedeutend geringer³⁾ und der Gastrolipase mangelt sie überhaupt⁴⁾.

Die Lipase-Ermittlung und ihre Anwendungen.

Bei der Ermittlung der Lipase dürfen die Herkunft der Präparate und die Umstände, unter denen sich ihre Aktivierung vollzieht, selbstredend nicht vernachlässigt werden. Für derartige Bestimmungen existieren denn auch die verschiedensten Vorschläge:

Grützner⁵⁾ empfiehlt, die Tropfen zu zählen, welche von der Fermentlösung angewendet werden müssen, um eine bekannte Quantität Mandelölemulsion zu spalten.

Kanitz⁶⁾ benutzt mit $\frac{1}{10}$ -normaler Natronlauge gegen Phenolphthalein neutralisiertes und durch Schütteln emulgiertes Oliven- oder Rizinusöl als Spaltobjekt und stellt die aus je 10 ccm der Oel-emulsion unter dem Einfluß von je 2—5 ccm einer lipasehaltigen Flüssigkeit während 10—24 Stunden bei Brutschranktemperatur in Freiheit gesetzte Fettsäuremenge titrimetrisch mit $\frac{n}{10}$ -Natronlauge und Phenolphthalein fest, wobei durch hydrolytische Dissoziation bedingten Titrationsfehlern durch vorherigen Zusatz von 50 ccm 96%igem Alkohol und 5 ccm Aether vorgebeugt wird. Um von Zufälligkeiten unabhängige Werte zu erhalten, werden wenigstens zwei Proben mit ungekochter und ebenso viele mit gekochter Lipaselösung gleichzeitig angesetzt und unter denselben Bedingungen, wie angegeben, behandelt. Der Mittelwert der erhaltenen Kubikzentimeter verbrauchter $\frac{n}{10}$ -Natronlauge bei den Versuchen mit aktivem Ferment, vermindert

¹⁾ Armstrong, Proc. Royal Soc. London 76, 606.

²⁾ Donath, Hofmeisters Beitr. 10 (1907) 390.

³⁾ Kalaboukoff u. Terroine, Soc. Biol. 63 (1907) 617.

⁴⁾ Donath, loc. cit.; Magnus, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48 (1906) 373; Laqueur, Hofmeisters Beitr. 8 (1906) 281.

⁵⁾ Grützner, Pflügers Archiv 12 (1876) 285.

⁶⁾ Kanitz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46 (1905) 482; Ber. d. chem. Ges. 36 (1903) 400.

um den Mittelwert der Kubikzentimeterzahlen, welche die Kontrollversuche mit gekochter Lipaselösung ergeben, liefern, mit 28,16 multipliziert, die Anzahl Milligramm der durch die Lipasewirkung abgespaltenen Oelsäure.

Man kann auch das bei der Einwirkung von Lipase auf eine bekannte Menge Milchfett oder eine Emulsion von Eigelb resultierende Gemisch nach Soxhlet untersuchen, oder besser, da man hierbei zu wenig ungespaltenes Fett findet, nach dem Vorschlag von Volhard¹⁾ und Stade²⁾ mit Aether ausschütteln und im Aetherextrakt Neutralfett und Fettsäure bestimmen.

Praktisch gestaltet sich die Ausführung der Volhard-Stadeschen Methode so, daß zu 10 ccm einer auf 38° vorgewärmten Eigelb-emulsion, die durch Vermischen eines Eidotters mit 30—40 ccm Wasser (oder um von Zufälligkeiten in der Zusammensetzung des Eigelbs unabhängiger zu sein, von mehreren Eidottern mit der entsprechend vermehrten Wassermenge) hergestellt worden ist, 2—5 ccm auf Bruttemperatur vorgewärmter Magensaft bzw. eine andere lipasehaltige Flüssigkeit gefügt werden. Dieses Reaktionsgemisch, oder nach dem Vorschlag von Zinßer³⁾ das ausgeheberte Eigelbprobefrühstück⁴⁾, bleibt dann während einer bestimmten Anzahl Stunden (bis 24) im Brutschrank von 38°, wird danach mit 75 ccm Aether und wenigen Kubikzentimetern Alkohol ausgeschüttelt, hierauf, nachdem die ätherische Schicht eine stark gelbe Farbe angenommen hat, ein Teil des Aetherextrakts, z. B. 20 ccm mit 20 ccm neutralem Alkohol versetzt und die infolge der Fermentwirkung in dieser Portion enthaltenen Fettsäuren mit $n/10$ -Natronlauge und Phenolphthalein bis zur beginnenden Rotfärbung titriert. Danach wird das durch die Titration neutralisierte Gemisch in einem ausgedämpften Kölbchen aus Jenaerglas mit 10 ccm normaler Natronlauge 2 Stunden auf dem Wasserbad am

¹⁾ Volhard, Zeitschr. f. klin. Medizin 62 u. 63.

²⁾ Stade, Inaug.-Dissert., Gießen sowie Hofmeisters Beitr. 3 (1902) 291; Riegel, in Nothnagels spez. Pathol., 2. Aufl., 1908.

³⁾ Zinßer, Hofmeisters Beitr. 7 (1906) 31; vgl. ferner über die Beurteilung des Grades der Fettspaltung im Magen auf Grund der gebildeten Fettsäuremenge (= Aziditätsunterschied des Filtrates und des unfiltrierten, mit alkoholischer $n/10$ -Kalilauge titrierten, aufgekochten Mageninhaltes nach Subtraktion der Azidität der verabreichten Suppe), bei Anwendung der butyrometrischen Methode von Sahli, dessen Lehrb. d. klin. Untersuchungsmethod., 6. Aufl. 1 (1913) 629, 645.

⁴⁾ Dasselbe besteht aus fünf Eigelb, welche zuvor im Halblitermaßkolben mit 14%iger Traubenzuckerlösung versetzt worden sind. Man füllt bis zur Marke mit der Traubenzuckerlösung auf, schüttelt kräftig bis zur vollständigen Emulgierung und hebert eine Stunde nach der Einnahme der Emulsion aus.

Rückflußkühler gekocht und die Kohlensäureabsorption durch ein aufgesetztes Natronkalkröhrchen ausgeschaltet. Das mit der Natronlauge versetzte Reaktionsgemisch kann auch statt des Kochens 24 Stunden gut verschlossen bei Zimmertemperatur stehen gelassen werden. Zu dem Reaktionsgemisch, in welchem nunmehr auch das von der Lipase unangegriffene Fett verseift worden ist, werden 10 ccm normale Schwefelsäure hinzugefügt, um die zur Verseifung benutzten 10 ccm normaler Natronlauge genau zu neutralisieren. Die abgespaltenen Fettsäuren werden dann wiederum durch Titration mit $n/10$ -Natronlauge und Phenolphthalein ermittelt. Werden z. B. bei der ersten Titration 15 ccm, bei der zweiten Titration dagegen 18 ccm $n/10$ -Natronlauge zur Neutralisation verbraucht, so daß also die maximal abgespaltene Fettsäuremenge $15 + 18 = 33$ ccm $n/10$ -Natronlauge entspricht, so berechnet sich der auf die Lipasewirkung entfallende Anteil zu $\frac{15 \cdot 100}{33} = 45,45 \%$.

Da nach Volhard auch hier das quadratische Fermentgesetz gilt, wonach die Verdauungsleistung x gleich ist der Quadratwurzel aus der Verdauungszeit t , multipliziert mit der Fermentmenge F , also $x = \sqrt{F \cdot t}$, so ergibt der quadrierte Prozentgehalt des gespaltenen Fettes dividiert durch die Verdauungszeit die in der betreffenden Lipaselösung enthaltene Anzahl Fermenteinheiten.

Anwendung der Lipasebestimmung zur Funktionsprüfung der Pankreasdrüse. Wie die Bestimmung der lipolytischen Wirkung des Magensaftes die Bestimmung seiner proteolytischen Fähigkeiten zu ergänzen und um so wertvollere diagnostische Anhaltspunkte zu geben vermag, je mehr die gerade beim fetthaltigen Probefrühstück ¹⁾ sehr erheblichen Störungen und Fehlerquellen von Seiten regurgitierten Duodenalinhaltes herabgesetzt werden können, so gilt dies auch für die lipolytische Wirkung der Pankreasdrüse, deren Funktionsprüfung Ehrmann ²⁾ auf die Ermittlung der Lipase im Pankreassekret gründet. Die Methode hat im Gegensatz zu den Verfahren, die für die Ermittlung der Magenlipase in Anwendung kommen, gerade zur Voraussetzung, daß durch das fetthaltige Probefrühstück der Duodenalsaft regurgitiert und die Wirkungen der Magenlipase auf das betreffende fettsäurefreie Fett nicht in Betracht fallen.

¹⁾ Von Volhard, Münchener med. Wochenschr. (1907) Nr. 9, und nach ihm von Tschlenoff wurde ein zu diesen Fermentuntersuchungen geeignetes Oelprobefrühstück vorgeschlagen, und von V. Koziczowski, Zeitschr. f. klin. Medizin 68, 261, ein entsprechendes Sahnefrühstück, bestehend aus 250 ccm Sahne.

²⁾ Ehrmann, Berliner klin. Wochenschr. (1912), 1363.

Daß fettreiche Nahrungsmittel ein Zurückfließen des Duodenalinhaltes in den Magen bewirken, hat zuerst Boldyreff¹⁾ gezeigt, und damit erst eine Basis geschaffen für die verschiedenen diastatischen, proteolytischen und lipolytischen Pankreasfermentuntersuchungen, die sich auf die Prüfung regurgitierten Duodenalinhaltes gründen.

Bei starker Azidität des Ausgeheberten kann die von Ehrmann herangezogene Reaktion schwach ausfallen oder fehlen, trotzdem die lipolytische Wirkung des Pankreassekretes nicht herabgesetzt ist. In solchen Fällen, oder wohl besser von vornherein, sollte daher dem Probefrühstück ein Teelöffel Natriumbikarbonikum²⁾, beigefügt werden. Auch mit diesem Zusatz verlangt jedoch die Methode, wie es unter den schwer ganz zu erfüllenden Voraussetzungen zu erwarten ist, Vorsicht in bezug auf die Schlußfolgerungen über die fettspaltende Fähigkeit der Pankreasdrüse. Die Vorsicht ist im Hinblick auf das Prinzip der Prüfung von Pankreasfermenten am in den Magen zurückgestiegenen Duodenalinhalt geboten. Grasmann³⁾ hält diese Prüfungsweise, ebenso wie den Nachweis von Stoffen im Stuhl oder Harn, an welchen sich die Pankreassekretwirkung dokumentiert⁴⁾, für ungeeignet, „um einwandfrei eine totale Pankreasinsuffizienz zu diagnostizieren, geschweige denn eine Differenzierung der jeweils gestörten einzelnen Pankreasfunktionen zu ermöglichen“. Ferner hat Grasmann (loc. cit.) geltend gemacht, daß das Oelprobefrühstück, — und dasselbe dürfte bis zu einem gewissen Grad für das hier in Frage kommende Pulminprobefrühstück gelten, — keinen normalen Reiz darstellt. Wenn auch der für die Trypsinbestimmung unter den angegebenen Bedingungen besonders verhängnisvolle zerstörende Einfluß, welchen selbst Salzsäurespuren⁵⁾ auf dieses Ferment ausüben,

¹⁾ Boldyreff, Zeitschr. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffwechsels (1908) Nr. 6.

²⁾ Man könnte auch zur Neutralisation der Salzsäure die von Lewinsky, Deutsche med. Wochenschr. (1908) 1582, empfohlene gebrannte Magnesia verwenden.

³⁾ Grasmann, Archiv f. Verdauungskrankh. 23 (1917) 479.

⁴⁾ S. z. B. die von Sahli, Deutsche med. Wochenschr. (1897) Nr. 1; Deutsches Archiv f. klin. Medizin 61, 475; Korrespondenzbl. f. Schweizer Aerzte (1898) Nr. 10 u. 11, in Vorschlag gebrachten, mit Methylenblau, Jodoform oder Salol gefüllten Glutoidkapseln, die erst unter dem Einfluß des Trypsins verdaut werden. Vgl. demgegenüber Fromme, Münchener med. Wochenschr. (1901) Nr. 15; Wahlenberg, Ueber die Symptome der gestörten Tätigkeit des Pankreas, Inaug.-Dissert., Bonn 1903, sowie die von Adolf Schmidt benutzten, im vorigen Abschnitt besprochenen kernhaltigen Gewebe.

⁵⁾ Siehe im Abschnitt über das Trypsin; vgl. ferner Abderhalden, loc. cit.; Mahlenberg, Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffwechsels (1909) Nr. 17 u. 18; Ehrmann u. Lederer, Deutsche med. Wochenschr. (1909) 879; Kölker, Guto siehe Korczynski, Wiener klin. Wochenschr. (1910) Nr. 32.

bei der Lipase in geringerem Maße in Betracht kommen dürfte, so fallen andere Fehlerquellen ¹⁾ ebenso sehr ins Gewicht. Trotz der ungünstigen Resultate, welche Grasmann (loc. cit.) gerade bei der Lipaseermittlung am direkt durch Duodenalausheberung mittels der Rosenbergschen Duodenalpumpe ²⁾ gewonnenen Saft erhielt ³⁾ — was vielleicht als eine Folge der für die Lipasebestimmung weniger durchgearbeiteten Methodik ⁴⁾ angesehen werden kann, — dürfte es sich wohl empfehlen, den Ehrmannschen Nachweis für aus dem Palmin in Freiheit gesetzte Fettsäuren statt auf den regurgitierten Duodenalininhalt auf den mit der Sonde ⁵⁾ an Ort und Stelle ⁶⁾ gewonnenen zu übertragen ⁷⁾. Dies wäre um so mehr angezeigt, als, wie Grasmann betont, keine Fermentuntersuchung für sich allein Schlüsse in bezug auf das Verhalten der anderen Fermente gestattet. So kann die proteolytische und lipolytische Fähigkeit Null, die diastatische dagegen sehr hoch sein. Eine Beurteilung der Funktionsfähigkeit der Pankreasdrüse verlangt daher eine vollständige Fermentuntersuchung in jeder Richtung.

Anwendung der Lipasebestimmung zur Ermittlung des Wirkungswertes von Pankreaspräparaten. Bei der Funktionsprüfung der Pankreasdrüse auf Grund der lipolytischen Wirkung ihres Sekretes ist demselben schon die zur Aktivierung der Pankreaslipase bzw. ihres Zymogens ⁸⁾ notwendige Galle beigemischt.

¹⁾ Siehe z. B. Landau u. Rzasnicki, Zeitschr. f. klin. Medizin 80 Heft 3 u. 4; Grasmann, loc. cit. S. 480.

²⁾ Ueber die Technik siehe Grasmann, loc. cit. S. 481—485.

³⁾ Im Gegensatz zu Grasmanns günstigen Resultaten bei der Trypsin- und Diastaseprüfung.

⁴⁾ Bondi u. Salomon, Beitr. z. d. Mitteil. d. Gesellsch. f. innere Medizin u. Kinderheilkunde 12 (Wien 1913) Nr. 9, ziehen demgegenüber gerade die Lipasebestimmung allen anderen Fermentermittlungsmethoden ihrer großen Einfachheit wegen vor.

⁵⁾ Vorausgegangen war die Methode von Einhorn, Berliner klin. Wochenschr. 46 (1910) I, 742, welcher ein an einem Seidenfaden befestigtes Eimerchen (Duodenaleimerchen) verschlucken und vom Magen in das Duodenum befördern ließ.

⁶⁾ Die Reaktion des Duodenalsaftes variiert begreiflicherweise mit der Entnahmestelle stark, nach Grasmann in der Norm von 8—16 ccm n/10-Natronlauge gegen Phenolphthalein und 20—40 ccm n/10-Salzsäure gegen Dimethylamidobenzol.

⁷⁾ Ueber die Verwendung von Duodenalsonde, -pumpe und -rohr siehe Einhorn, Deutsche med. Wochenschr. (1910) 1509; Berliner klin. Wochenschr. (1910) 522; Groß, Oefele u. Rosenberg, Wiener klin. Wochenschr. 23 (1910) 1165; Groß, Münchener med. Wochenschr. (1910) Nr. 22.

⁸⁾ Vgl. auch im vorigen.

Dieselbe oder ein gleichwertiger Aktivator muß dagegen hinzugefügt werden, wenn es sich um die Bestimmung des lipolytischen Wirkungswertes der — wie alle Drüsenpräparate ständig an Bedeutung zunehmenden — Pankreaspräparate handelt. Es ist diese Bestimmung nicht minder wichtig als diejenige der proteolytischen oder diastatischen Spaltungswirkungen, welche letztere durch die Lipaseermittlung, wie bei den Funktionsprüfungsversuchen der Pankreasdrüse ergänzt werden und viceversa. Auch hier darf keinesfalls aus einem hohen diastatischen oder proteolytischen Effekt von vornherein auf einen hohen lipolytischen Wert geschlossen werden oder umgekehrt, da je nach der Art wie das Präparat gewonnen wird, der Gehalt an den einzelnen Fermenten variiert. Dies gilt natürlich auch für die Bereitung von lipolytisch wirkenden Präparaten anderer Herkunft.

Was die Herstellung von Lipasepräparaten betrifft, so läßt sich aus der Funduspartie durch mehrtägige Extraktion der abgelösten und gut zerkleinerten frischen Magenschleimhaut des Schweines oder Hundes nach Fromme¹⁾ ein stark wirksames Lipasepräparat gewinnen, und ein eben solches kann nach Hamsik²⁾ aus der mit dem Messerrücken abgeschabten Darmschleimhaut durch sukzessive, je einstündige zweimalige Extraktion mit Alkohol und danach mit Alkoholäther und Äther erhalten werden. Der zwischen Filtrierpapier abgepreßte, getrocknete und in der Reibschale zerriebene Rückstand der Darmschleimhaut stellt ein lange haltbares Lipasetrockenpräparat dar.

Für die Darstellung von Phytolipase eignen sich als Ausgangsmaterial am besten geschälte Rizinussamen, von denen nach Nicloux³⁾ 200 g mit 250 g Cottonöl gründlichst zerrieben werden. Nach dem Absetzen der unwirksamen gröberen Bestandteile beim Zentrifugieren der Mischung wird die die Lipase enthaltende Aufschlammung abgessen und durch mehrmaliges Mischen und Dekantieren mit dem gleichen Volumen (200—250 ccm) Petroläther entölt. Der die Rizinuslipase enthaltende Rückstand bleibt schließlich als weißes, sehr haltbares Pulver zurück. Ein solches kann ferner durch Extraktion der zerriebenen Rizinussamen nach der Methode von Falk u. Nelson⁴⁾ mittels Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff und Mahlen des Rückstandes, oder nach Tanaka⁵⁾, durch Extraktion der Samen mit der 6fachen Menge 1/10-normaler Essigsäure bei 30—35°, gründliches Nachwaschen mit Wasser und Trocknen des Rückstandes bei 40° gewonnen werden. Auch bei der Herstellung von Preßsäften aus Brassicasamen fanden H. u. Astr. Euler⁶⁾ die Lipase im Rückstand. Dagegen ist es nach Hoyer⁷⁾ möglich, eine

¹⁾ Fromme, Hofmeisters Beitr. 7 (1906) 51.

²⁾ Hamsik, Zeitschr. f. physiol. Chem. 59 (1909) 1.

³⁾ Nicloux, Compt. rend. 138 (1904) 1112; Compt. rend. Soc. Biol. 56 (1904) 840; siehe ferner Jalander, Biochem. Zeitschr. 36 (1912) 438.

⁴⁾ Falk und Nelson, Journ. Amer. Chem. Soc. 34 (1912) 735.

⁵⁾ Tanaka, Journ. Coll. Engin. Tokyo 5 (1912) 125.

⁶⁾ H. und Astr. Euler, Zeitschr. f. physik. Chem. 81 (1907) 244.

⁷⁾ Hoyer, Ber. d. chem. Ges. 37 (1904) 1436; Zeitschr. f. physiol. Chem. 50 (1907) 430.

wäßrige Emulsion des Enzyms durch Zermahlen der Rizinussamen mit Wasser in einer Exzelsiormühle und Zentrifugieren der Flüssigkeit in einer Ueberlaufzentrifuge von hoher Tourenzahl zu gewinnen. Während der Selbstgärung dieser Fermentmilch bei 24° geht das Rizinusöl in Rizinsäure über, wodurch die sich in der Oberflächenschicht als dicke Emulsion abscheidende Lipase bzw. deren Zymogen zugleich die für die Entfaltung ihrer Wirkung notwendige Säure in optimaler Konzentration erhält.

Bei der Behandlung der Pankreasdrüse nach Rosenheim und Shaw-Makenzie¹⁾, welche frisches, feingehacktes Schweinepankreas mit zwei Gewichtsteilen Glycerin extrahieren²⁾, zeigt das gereinigte Glycerinextrakt nur noch lipolytische Wirkungen, und auch diese erst nach dem Zusatz einiger Tropfen 1%iger Kalziumchloridlösung (ein Tropfen pro 5 ccm Flüssigkeit). Denn das begleitende Kalksalz, welches nach Pekelharing (loc. cit.) als natürliches Koenzym der Lipase fungiert, wird beim Versetzen des Pankreasglycerinextraktes mit Wasser (entsprechend der Herstellungsvorschrift loc. cit.) von diesem aufgenommen und damit von der Lipasefraktion abgetrennt. Man könnte natürlich statt des Chlorkalziumzusatzes das Verdünnungswasser, welches das lipasebegleitende Kalksalz enthält oder das Dialysat vom Pankreassaft eindampfen und als aktivierendes Agens benutzen. Auch frisches Serum³⁾ und Organpreßsäfte (Leber, Muskel)⁴⁾ tun denselben Dienst; dies wohl ebenfalls infolge ihres Salzgehaltes, da die aktivierende Wirkung beim Serum, die sich bei konsumierenden Krankheiten noch verstärkt⁵⁾, auch bei 90° nach Grinjew⁶⁾ erhalten bleibt. Gegenüber den von Rosenheim und Shaw-Makenzie (loc. cit.) und in analoger Weise, durch Mazeration mit der 2—3fachen Glycerinmenge, von Kanitz⁷⁾, und aus Trockenpankreas von Ham-

¹⁾ Rosenheim u. Shaw-Makenzie, Journ. Physiol. 40 (1910) VIII; Physiol. Soc. VIII—XII, 14. u. 19. Februar 1910; Proc. Royal Soc. London, April 1910; siehe ferner Pekelharing, Zeitschr. f. physiol. Chem. 81 (1912) 355.

²⁾ Das während 24 Stunden gebildete Glycerinextrakt wird nach dem Kollieren mit der 10fachen Wassermenge und so wenig Essigsäure versetzt, daß Lackmuspapier eben gerötet wird. Mit der geringen Azidität hängt es zusammen, daß bei diesem Verfahren kein Trypsin oder Trypsinogen mit der Lipase gefällt wird. Es ist dies wichtig für die Haltbarkeit der Präparate, da namentlich bei fehlendem Eiweiß Lipase leicht durch Trypsin zerstört wird, wie Terroine, Compt. rend. Soc. Biol. 65 (1908) 329, gezeigt hat.

³⁾ Achard u. Clerc, Compt. rend. Soc. Biol. 56 (1904) 812; Donath, Hofmeisters Beitr. 10 (1907) 390

⁴⁾ Minami, Biochem. Zeitschr. 39 (1912) 392.

⁵⁾ Shaw-Makenzie u. Rosenheim, Proc. Royal Soc. Med. (April 1910).

⁶⁾ Grinjew, Charkow. Med. Journ. 7 (1909) 382; Malys Jahrb. (1909) 190.

⁷⁾ Kanitz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46 (1905) 482.

sik¹⁾ (1 g zu 100 ccm Glyzerin) erhaltenen Präparaten der Pankreasdrüse, sowie den Präparaten von Pottevin²⁾ und Grübler (Steapsin)³⁾ zeigt das Pankreatin die schon in den betreffenden Abschnitten erwähnten proteolytischen und diastatischen Wirkungen.

Um den lipolytischen Einfluß des Pankreatins zu bestimmen, stellt man sich mittels der 10fachen Menge Glyzerin ein Extrakt des Pankreatins her, an welchem nach dem Zentrifugieren direkt die Wirkung ermittelt werden kann.

Außer den schon erwähnten Neutralfetten werden zur Prüfung der genannten und verwandter Präparate, wie auch frischer Organbreie und daraus hergestellter wäßriger Lösungen⁴⁾ bzw. Pseudolösungen oder Suspensionen⁵⁾, gegen Lackmus neutral reagierende Butter und das in nächster Beziehung zu den Fetten stehende Lezithin benutzt.

Die Variationen des Substrates bei der Bestimmung von Lipasen verschiedener Herkunft.

a) Butter als Substrat. Mit Hilfe von Butter ermittelt Saxl⁶⁾ die lipolytische Wirkung von Organen in der folgenden Weise:

Vier 100 ccm fassende Kölbchen werden mit je 10 g des fein zerhackten Organs, 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung und 3 ccm Toluol beschickt. Hierauf gibt man in zwei der Kölbchen je 1 g Butter, schüttelt kräftig und stellt die Kölbchen 1—3mal 24 Stunden in den Brutschrank. Danach werden auch die beiden Kontrollkölbchen

¹⁾ Hamsik, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71 (1911) 238.

²⁾ Pottevin, Compt. rend. 138 (1904) 378.

³⁾ Für die Bestimmung des Wirkungswertes von Steapsin wird 1 g in 10 ccm Wasser aufgeschwemmt und durch tropfenweisen Natriumkarbonatzusatz neutralisiert und gelöst.

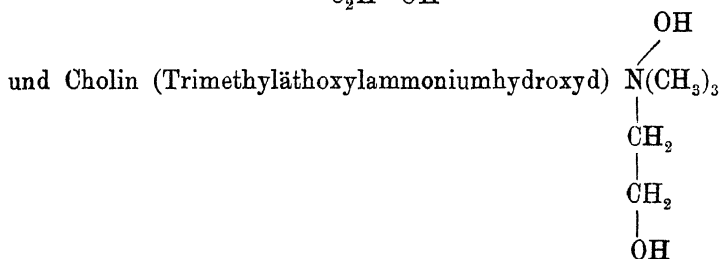
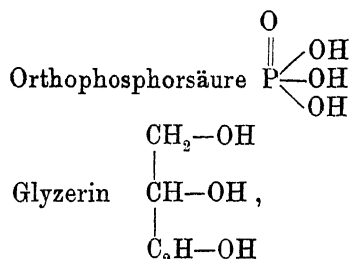
⁴⁾ Nach den Versuchen von Lewkowitsch u. Macleod, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 72 (1904) 31, sind wäßrige Mazerationen frischer Gewebe nur schwach wirksam, während Stolz, Zur Kenntnis des Pankreassteapsins, Inaug.-Dissert., Gießen 1907; Biochem. Zentralbl. 6, 2388, aus Trockenpräparaten, die das Ferment in konzentrierterer Form enthalten, ziemlich wirksame wäßrige Extrakte erhielt. Nach Kastle u. Loevenhart, Amer. Chem. Journ. 24 (1900) 491, 27, 481, 31, 521, wirkt verdünnte Salzsäure n/1000 günstig auf die Extraktion, und sie benutzten daher solche Säure zur Herstellung wäßriger, lipolytisch wirkender Leberextrakte. Doch könnte es sich auch einfach um eine aktivierende Wirkung der Säure handeln, derzufolge die geringen, im Wassereextrakt vorhandenen Lipasemengen eine stärkere Wirkung entfalten.

⁵⁾ Siehe Berczeller, Biochem. Zeitschr. 34 (1911) 170, der die Lipase für unlöslich in allen geprüften Lösungsmitteln hält.

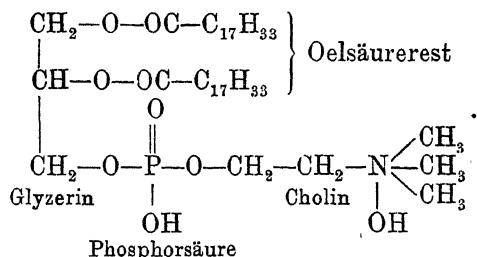
⁶⁾ Saxl, Biochem. Zeitschr. 12 (1908) 343.

mit je 1 g Butter versehen, alle vier Proben aufgekocht, filtriert, das Filter mit destilliertem Wasser gründlich ausgewaschen und die Säuremenge durch Titration mit n_{10} -NaOH und Phenolphthalein als Indikator in sämtlichen Kölbchen festgestellt.

b) Lezithin als Substrat und die Frage der Spezifität der Lezithinase. Was die als Substrat verwendeten Lezithine betrifft, so unterscheiden sie sich von den Neutralfetten, wie z. B. dem Olein oder Palmin, dadurch, daß nicht alle drei Hydroxylgruppen des Glycerins mit der betreffenden Fettsäure verestert sind, sondern nur deren zwei. Die dritte Hydroxylgruppe des Glycerins ist dagegen bei den Lezithinen — deren Unterschiede genau so wie bei den verschiedenen Fetten durch die ungleichen Fettsäuren in ihrem Molekül bedingt sind — mit der Phosphorsäure verestert, die jedoch nicht frei, sondern an Cholin gebunden ist. Man würde also z. B. mittels Oelsäure $C_{18}H_{34}O_2$,



das folgende Lezithin aufbauen können:



Bei dieser Formel ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Bindungsart des Cholins an die Phosphorsäure nicht ganz sichergestellt

ist. Es könnte ebenso gut die basische Gruppe des Cholins, wie die alkoholische unter Wasserabspaltung mit der Glycerinphosphorsäure bzw. deren Fettsäureestern reagieren, so daß dann also ein Salz statt eines Esters des Cholins im Lezithin vorliegen würde.

Die Eigenart der Lezithine hat die nach immer neuen Fermenten suchenden Forscher veranlaßt, ein besonderes auf dieses Substrat eingestelltes Ferment, die Lezithinase, zu postulieren. Doch geht dies entschieden zu weit, da jedenfalls der Nachweis erbracht ist ¹⁾, daß Magen und Rizinuslipase sowie auch das Steapsin (Grübler) Lezithin zu spalten vermögen und bei dieser Spaltung geradeso wie bei der Einwirkung auf andere Fettstoffe durch geringe Säuremengen aktiviert werden ²⁾. Daß bei der Blutlipase keine Spaltungswirkung nachgewiesen werden konnte, bedeutet keinen Unterschied, da ja auch gegenüber Neutralfett eine solche erst durch die empfindliche stalagmometrische Methode von Rona und Michaelis (loc. cit.) angezeigt worden ist. Allerdings soll nach Stassano und Billon ³⁾ sowie Kalaboukoff und Terroine ⁴⁾ auch Pankreassaft das Lezithin nicht zu spalten vermögen, was jedoch von Wohlgemuth ⁵⁾ bestritten wird. Das Lezithin dürfte also ziemlich allgemein dort angegriffen werden, wo sich Lipase findet.

Alle Lipasepräparate wären dementsprechend zugleich Lezithinasepräparate. Wenn der Parallelismus im Vorkommen und das Zusammengehen der Wirkungen noch nicht ausreichend sein sollten, um von einer besonderen Lezithinase Abstand zu nehmen, so müßte die absolute Identität der bei den Neutralfetten und beim Lezithin für die Aufspaltung in Frage kommenden Bindungen entscheidend sein für die Annahme, daß die Lezithinasewirkung der gewöhnlichen Lipasewirkung zu subsummieren ist. Wollte man trotz alledem an einer besonderen Lezithinase festhalten, so müßte man mit mindestens ebenso großem Recht besondere Lipasen: Palmitinase, Oleinase, Stearinase usw. annehmen, je nach der Art des zu spaltenden Neutralfettes, und wiederum besondere Lezithinasen, je nach der Natur der im Lezithin enthaltenen Fettsäuren. Denn jedenfalls variiert die Bindung zwischen dem Glycerin und dem Fettsäurerest, z. B. bei einem Oelsäure ent-

¹⁾ Schumoff-Simanowski u. Nadina Sieber, Zeitschr. f. physiol. Chem. 49 (1906) 50.

²⁾ Es wurde etwas n/10-Schwefelsäure zum Reaktionsgemisch hinzugefügt.

³⁾ Stassano u. Billon, Compt. rend. Soc. Biol. 55 (1903) 482.

⁴⁾ Kalaboukoff u. Terroine, Compt. rend. Soc. Biol. 66 (1909) 176.

⁵⁾ Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. 39 (1912) 302.

haltenden Lezithin, und beim Olein weniger, als dies bei verschiedenen Neutralfetten unter sich und verschiedenen Lezithinen unter sich der Fall ist, in denen die Veresterung mit dem Glycerin hier durch Oelsäure, dort durch Palmitin- oder Stearinsäure erfolgt. Daß das dritte Glycerinhydroxyl im Lezithin anders verestert ist als in den Fetten, kommt nicht in Frage, da diese Bindung weder durch eine Lipase, noch durch eine „Lezithinase“ aufgespalten wird, sondern, wie man annimmt, ein eigenes fermentatives Prinzip zu ihrer Aufspaltung benötigt, das als Glycerophosphatase bezeichnet wird und erst nach vorausgegangener Loslösung der Fettsäurereste aus dem Lezithin durch die Lipase- (Lezithinase-) Wirkung in Funktion tritt. Seine Bestimmung findet sich im Anschluß an die lipolytische Lezithinspaltung im folgenden besprochen.

Die Verwendungsweise des Lezithins zur Ermittlung der lipolytischen Wirkung eines Extraktes erfolgt in der Form einer 2%igen wäßrigen Emulsion, welche einerseits mit dem rohen, andererseits mit dem gekochten Extrakt vermischt in den Brutschrank gestellt wird. Die Feststellung des Auftretens einer sauren Reaktion in der ungekochten Probe bei negativem Ausfall in der Kontrolle beweist dann das Vorhandensein eines lipolytischen Enzyms beim Lezithin ebenso gut, wie wenn das zu prüfende Material mit z. B. 10 ccm einer anderen künstlich hergestellten, neutralen Fettemulsion oder mit Milch angesetzt und auf die Farbänderung des mit etwas Alkali- und Lackmuslösung eben gebläuten Reaktionsgemisches geprüft wird.

Bei der quantitativen Bestimmung auf diesem Wege bedient man sich einer Lezithinemulsion, die durch Lösen von 2 g Lezithin in 5 ccm Methylalkohol und allmählicher Zugabe von 100 ccm destilliertem Wasser unter Erwärmen, Rühren und gründlichem Durchschütteln gewonnen wird. Nach dem Verjagen des Methylalkohols auf dem lebhaft kochenden Wasserbad (was einige Minuten in Anspruch nimmt) werden je 10 ccm der abgekühlten Substratemulsion in vier Kölbchen verbracht, von denen zwei mit je 1–2 ccm rohem und zwei mit je 1–2 ccm gekochtem Fermentextrakt beschickt worden sind. Nach der Zugabe von etwas Toluol kommen alle vier Kölbchen auf 24 Stunden in den Brutschrank, werden danach mit 30 ccm Alkohol und 1 Tropfen Phenolphthalein versetzt und mit $n/20$ -Natronlauge titriert. Die Differenz der Mittelwerte der verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter bei den beiden Hauptversuchen und den beiden Kontrollen, die natürlich um so größer ist, je mehr Fettsäure aus dem Lezithinmolekül abgespalten wurde, bildet dann das Maß für die lipolytische Wirkung des frag-

lichen Extraktes. In ganz ähnlicher Weise läßt sich das Lecithin auch an Stelle der Eigelbemulsion bei der Methode von Volhard-Stade (loc. cit.) verwenden¹⁾.

Die Glycerophosphatase. Das Charakteristische der Wirkung der zuerst in der Hefe von Neuberg und Karczag²⁾, dann von Großer und Husler³⁾ namentlich in der Niere und der Darmschleimhaut sowie in den Fäzes aufgefundenen Glycerophosphatase besteht in der Beschleunigung der Hydrolyse der freien oder an Cholin gebundenen Glycerinphosphorsäure. Die Ermittlung dieses Fermentes beruht demnach auf der Bestimmung der durch dasselbe abgespaltenen Phosphorsäure.

Als Substrat verwenden Großer und Husler eine 1%ige wäßrige Lösung von Natriumglyzerophosphat (Merck) (das keine organischen Phosphorverbindungen enthalten darf) und überlassen je 20–40 ccm derselben bei Gegenwart von Toluol mit je 5–10 ccm rohem bzw. 5–10 ccm gekochtem Organextrakt oder 5 g Organpulver während 24 Stunden sich selbst im Thermostaten. Um Tauschungen durch autolytische Fermente zu vermeiden, empfiehlt es sich eine weitere Kontrolle nur mit Organextrakt oder Organpulver und Kochsalzlösung an Stelle der Glycerophosphatlösung anzusetzen. Das Eiweiß in den verschiedenen Proben wird durch Zusatz von etwas Kochsalz, Kaolin und zwei Tropfen Eisessig entfernt. Wenn sich danach freie Phosphorsäure durch ammoniakalische Magnesiamischung oder salpetersaure Molybdänlösung nachweisen läßt, wird die Phosphorsäure mit der erstgenannten Lösung ausgefällt, abfiltriert und das Filtrat verascht (Neumann). Hat vollständige Spaltung der Glycerinphosphorsäure stattgefunden, so läßt sich nach dem Veraschen im Filtrat keine Phosphorsäure mehr nachweisen. Andernfalls wird dieselbe in einem Teil des Filtrates als pyrophosphorsaure Magnesia bestimmt. Die Differenz dieser und der in der Stammlösung enthaltenen, mit dem Glycerin veresterten Phosphorsäure ergibt die Menge der durch die Glycerophosphatase abgespaltenen Phosphorsäure.

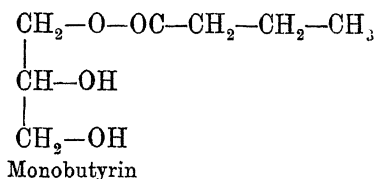
c) Monobutyryn als Substrat und die Frage der Spezifität der Monobutyrynase. Was im vorigen für das Lecithin ausgeführt wurde, gilt in derselben Weise für Glycerinester, bei denen nur eine partielle Veresterung der alkoholischen Hydroxyle des Glycerins stattgefunden hat. Auch hier besteht die Frage, ob diese Abweichung, — welche sich an Teilen des Moleküls geltend macht, die von der Hydrolyse nicht betroffen werden, während die aufzuspaltende Bindung hier wie dort völlig identisch ist, — ausreicht, um die Annahme eines besonderen Fermentes zu rechtfertigen. Da sich auch hier zu der Identität der aufzuspaltenden Bindung der Parallelismus im Vorkommen gesellt,

¹⁾ Schumoff-Simanowski u. Nadina Sieber, loc. cit. Fußnote 1, S. 484.

²⁾ Neuberg u. Karczag, Biochem. Zeitschr. 36 (1911) 60.

³⁾ Großer u. Husler, Biochem. Zeitschr. 39 (1912) 1.

so dürfte es von vornherein wenig einleuchtend sein, daß ein besonderes Monobutyrim und verwandte Körper aufspaltendes Enzym in Funktion tritt. Nichtsdestoweniger ist die Existenz eines solchen behauptet und das vermutete Ferment mit dem Namen Monobutyrimase belegt worden, da das wichtigste in Betracht fallende Substrat dieser Art das Monobutyrim ist, ein Ester des Glyzerins also, bei welchem nur ein einziges Hydroxyl, und zwar durch die Buttersäure verestert ist:



Die Verwendung des Monobutyrim in der Fermentanalyse gründet sich auf die Zunahme des Säuregrades eines im Brutschrank gehaltenen Gemisches von 1—2 ccm der Fermentlösung mit 10 ccm einer wäßrigen mit verdünnter Sodalösung gerade neutralisierten und danach filtrierten homogenen Emulsion, die in 100 ccm destilliertem Wasser 1 ccm Monobutyrim enthält. Der Versuch wird doppelt angesetzt und ebenso zwei Kontrollen mit den gleichen Mengen Monobutyrim und den gleichen Mengen des zuvor gekochten Fermentextraktes. Nach 10—24stündigem Aufenthalt im Brutschrank wird zu jeder Probe ein Tropfen Phenolphthalein zugefügt und mit $n/20$ -Natronlauge titriert. Die Differenz der Mittelwerte der Hauptversuche und der Kontrollen ergibt dann die durch die Monobutyrimasewirkung veranlaßte Säurezunahme.

Das Monobutyrim eignet sich dann vor allem auch als Substrat für die stalagmometrische Lipasebestimmung nach Rona und Michaelis¹⁾, die auf der mit der Spaltung einhergehenden Vermehrung der Oberflächenspannung beruht. Der Grad dieser letzteren wird durch die Abnahme der Tropfenzahl der Reaktionsgemische ermittelt. Zu dem Zwecke wird ein etwa 100 Tropfen destilliertes Wasser fassendes Stalagmometer von Traube mit dem kräftig durchgeschüttelten Gemisch von 1—2 ccm der auf Lipase zu prüfenden Flüssigkeit, 50 ccm einer Monobutyrimlösung (die aus 4—5 Tropfen Monobutyrim pro Liter Wasser hergestellt wird)²⁾ und 2 ccm einer die Neutralität auch wäh-

¹⁾ Rona u. Michaelis, Biochem. Zeitschr. 31 (1911) 345.

²⁾ Trotz der geringen Monobutyrimmenge bleibt ein Teil desselben beim Schütteln mit Wasser ungelöst, der nach dem Absetzen durch Filtration der Lösung durch ein feuchtes Filter abgetrennt werden muß. Zur Sicherheit wird das Filtrat in einen Scheidetrichter eingefüllt und nach einiger Zeit — wenn sich even-

rend der Spaltung konstant haltenden Mischung von 1 Teil $\frac{1}{3}$ molarem primärem Natriumphosphat¹⁾ mit 7 Teilen $\frac{1}{3}$ molarem sekundärem Natriumphosphat²⁾ beschickt und sofort die Zahl der ausfließenden Tropfen bei 18° bestimmt. Hierauf kommt das Reaktionsgemisch auf $\frac{1}{2}$ Stunde in den Brutschrank, wird wieder auf 18° abgekühlt und die Tropfenzahl mittels des Stalagmometers von neuem ermittelt. Die Abnahme der Tropfenzahl ist dann ein Maß für das Fettspaltungsvermögen der betreffenden Flüssigkeit.

Die lipolytische Wirkung des Blutes und anderer Körperflüssigkeiten, geprüft am Monobutyryn, haben verschiedene Autoren zu diagnostischen Zwecken herangezogen, wobei nach dem Vorgang von Hanriot und Camus³⁾ die durch eine bestimmte Menge Krankenserum in Freiheit gesetzte Buttersäure, wie im vorigen ausgeführt wurde, titrimetrisch ermittelt wird.

Zeri⁴⁾ und Memmi⁵⁾ finden für die Exsudate ein viel größeres Spaltungsvermögen gegenüber Monobutyryn als für die Transsudate, und schlagen die Benutzung dieser Tatsache für die Differenzierung vor. Erwähnt sei auch noch besonders, daß die Prüfung auf Lipase (Monobutyrynase) für die Harnanalyse in Betracht kommt, da z. B. — wie schon erwähnt — Zeri⁶⁾, sowie Loeper u. Ficaï⁷⁾ bei schweren Nierenverletzungen, bei Pankreaserkrankungen und ferner bei vermehrtem Lipasegehalt des Blutes aus einem der schon angeführten Gründe, einen Uebertritt des Fermentes in den Harn konstatierten. Ferner findet sich nach Garnier⁸⁾ Lipase in Aszites-, Hydrozele-, Vesikator- und Amniosflüssigkeit. Im Stuhl findet sich echte Lipase bei Säuglingen⁹⁾.

tuell durch das Filter gegangenes ungelöstes Monobutyryn an der Flüssigkeitsoberfläche angesammelt hat — das für die Versuche erforderliche Quantum abgelassen.

¹⁾ Hergestellt aus 10 ccm molarer Phosphorsäure, 10 ccm normaler Natronlauge und 10 ccm Wasser.

²⁾ Hergestellt aus 10 ccm der molaren Phosphorsäure plus 20 ccm normaler Natronlauge.

³⁾ Hanriot u. Camus, *Compt. rend.* **124** (1897) 235; siehe auch Hanriot, *Ebenda* **123**, 753 und *Soc. Biol.* **48** (1896) 925.

⁴⁾ Zeri, *Policlinico, Sez. media* **10**, fasc. 11; zitiert nach *Biochem. Zentralbl.* **2** (1904) 921.

⁵⁾ Memmi, *Clinic. med. ital.* **3**; zitiert nach *Biochem. Zentralbl.* **4** 1905/06) 298.

⁶⁾ Zeri, *Policlinico, Sez. pratica* **12** (1905); zitiert nach *Biochem. Zentralbl.* **4** (1905/06) 1509.

⁷⁾ Loeper u. Ficaï, *Soc. Biol.* **62** (1907) 1018, 1033.

⁸⁾ Garnier, *Compt. rend. Soc. Biol.* **65** (1903) 1557; Garnier u. Frunsholtz, *Archiv de méd. expér.* **15** (1903) 785.

⁹⁾ Hecht, *Wiener klin. Wochenschr.* **21** (1908) 45, 550.

Wie weit die von Carrière¹⁾, Achard und Clerc²⁾, Garnier³⁾, Doyon und Morel⁴⁾ an Blut und pathologisch veränderten Körperflüssigkeiten gefundenen Lipasewerte, welche bei Diabetes, wie erwähnt, Vermehrung, bei Karzinom sowohl im Blut wie im Magensaft⁵⁾ (von Pesthy, loc. cit.), bei Ikterus, Pneumonie, Intoxikationen usw. Verminderung ergaben, zu diagnostischen und prognostischen Schlüssen verwendet werden können, muß jedoch noch abgewartet werden, bis die Frage mit absoluter Sicherheit entschieden ist, ob wir in der Spaltung des Monobutyryns eine Wirkung der echten Lipase messen, die den anderen lipolytischen Einflüssen derselben auf der ganzen Linie parallel läuft, oder ob wir es in dem monobutyrynspaltenden Ferment mit einer Monobutyrynase von eigenem Gepräge zu tun haben, die sich in geringerem oder höherem Maße mit der echten Lipase vergesellschaften kann⁶⁾.

Im letzteren, im übrigen wenig wahrscheinlichen Fall würde den an einem synthetischen Produkt wie dem Monobutyryn ermittelten lipolytischen Werten der Sera wohl kaum größere Bedeutung zuzusprechen sein; denn den Kliniker interessieren vornehmlich qualitative und quantitative Aufschlüsse über solche Fermente, die Abbau und Wiederaufbau von Organbestandteilen regeln oder denen die Beseitigung von in die Blutbahn gedrungenen Erregern zufällt. Weder in der einen noch in der anderen Beziehung würde aber eine besondere Monobutyrynase diesen Anforderungen genügen.

Man könnte daran denken, die an den Blutkörperchen zutage tretende lipolytische Wirkung als Maß für den Lipasegehalt zu betrachten, und sicherlich sollte, besonders auch mit Rücksicht auf die immunobiologische Bedeutung der Hämolyse, dieser letzteren bei Blutproben, die unter kontrollierbaren Bedingungen gewonnen wurden, mehr Beachtung geschenkt werden. Wir dürfen aber nicht vergessen, daß das Phänomen der Hämolyse wohl nur zum geringeren Teil vom lipolytischen Vermögen eines Serums abhängt, sondern daß vielmehr die stark variierende Resistenz der Blutkörperchenhülle und wahrscheinlich in noch

¹⁾ Carrière, Soc. Biol. 51 (1899) 989.

²⁾ Achard u. Clerc, Compt. rend. 129 (1899) 781; Arch. méd. exp. 14 (1902) 809.

³⁾ Garnier, Soc. Biol. 55 (1903) 1423, 1557; Garnier u. Fruhinsholtz, Arch. méd. exp. 15 (1903) 785.

⁴⁾ Doyon u. Morel, siehe deren zahlreiche Arbeiten in Soc. Biol. von Bd. 55 (1903) an, z. B. 55 (1903) 682.

⁵⁾ Außerdem kann die Magenlipase analog wie Pepsin und Lab bei Hypo- und Achylieen vermindert sein oder fehlen. Zum Unterschied von den proteolytischen Enzymen soll sie dagegen auch bei Hyperchylie (Zinßer, loc. cit.) vermindert sein.

⁶⁾ Siehe z. B. Bénech u. Guyot, Soc. Biol. 55 (1903) 994.

höherem Maße eine bei Infektionskrankheiten mit hohem Fieber, namentlich Typhus, vorhandene Hypotonie des Serums¹⁾ von Bedeutung sind. So beobachtete ich bei schwersten Typhusfällen, bei welchen Leitfähigkeit, Kochsalz-, Aziditäts- und Alkaleszenzbestimmung einen außerordentlich niedrigen Gehalt an Blutsalzen ergaben, Hämolyse, die man vor allem dieser Salzverminderung zuschreiben dürfte.

Dafür, daß es sich bei der Monobutyrynase um ein selbständiges Fermentindividuum handelt, ist der Befund von P. Th. Müller²⁾ herangezogen worden, wonach diese Esterase im Gegensatz zur Lipase nicht dem Schütz-Borißowschen quadratischen, sondern einem einfachen Proportionalitätsgesetz folgt, sowie die seither durch Rona und Michaelis (loc. cit.) sowie Izar (loc. cit.) widerlegte Angabe von Arthus³⁾, daß Neutralfette im Blut überhaupt keine Spaltung erleiden.

Nur die durch Monobutyrynase angreifbaren Ester, das Monobutyryn selbst, wie auch einfachste Fettsäureester (HCOOC_2H_5 usw.) würden nach jenen älteren Angaben im Blut eine Zersetzung erleiden, und zwar um so leichter, je niedriger ihr Molekulargewicht ist. So kann man hier, wie beim Harn usw., genau in derselben Weise wie dies für das Monobutyryn angegeben ist, mit einer 1%igen wäßrigen, mit schwacher Sodalösung neutralisierten Aethylbutyratlösung arbeiten.

Was die früher behauptete Nichtspaltbarkeit von Neutralfetten im Blut⁴⁾ betrifft, so muß wohl auch geltend gemacht werden, daß hierfür eher die Unvollkommenheiten des Reagenzglasversuches und nicht ein physiologisch kaum zu verstehender natürlicher Mangel verantwortlich zu machen sind. Wir sind nicht imstande die, gerade für den Ablauf fermentativer Reaktionen in der Blutbahn ohne Zweifel außerordentlich wichtigen, Alkaleszenzschwankungen zu imitieren, wie sie durch den im arteriellen und venösen Blut ungleichsinnigen Austausch von CO_2 und Cl' -Ionen zwischen Blutkörperchen und Serum gegeben sind⁵⁾, und vor allem tragen wir der natürlichen Hemmung durch die Gegenwart der Spaltprodukte nicht Rechnung. Der von der Nahrungsaufnahme und deren Qualität mitbestimmte Gehalt des Blutes an Fett und Fettspaltprodukten zur Zeit der Blutentnahme, die kürzere oder längere Zeit, während der dieses Fett der

¹⁾ Ueber die Bedeutung der Erscheinung siehe *Allg. Teil*, S. 555.

²⁾ P. Th. Müller, Wiener Akad. Ber. 114 (1905) 1.

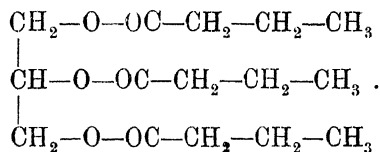
³⁾ Arthus, Journ. Physiol. Pathol. 4 (1902) 455.

⁴⁾ Vgl. auch Cohnstein u. Michaelis, Pflügers Archiv 65 (1896) 473, 69 (1898) 76, über die Veränderung der Chylusfette im Blut.

⁵⁾ Siehe darüber Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre, Wiesbaden 1902. S. 261—310.

Einwirkung der Serolipase in vivo und im Reagenzglas untersteht und damit die Menge der zur Versuchszeit vorhandenen Spaltprodukte können infolge der Identität der alkoholischen Komponente einen Einfluß auf die Versuchsergebnisse besitzen, der vielleicht hinreichend ist, um die starken Differenzen zu erklären, welche Melis-Schirru¹⁾ selbst bei der Monobutyrynhydrolyse normaler Seris feststellen konnte. Ist die der Monobutyryrinase zugeschriebene Wirkung nur ein Teileffekt der Lipase, so könnte man die viel leichtere Spaltung des Monobutyryns gegenüber dem Neutralfett mit in dem Umstand begründet sehen, daß wir bei Zusatz von Monobutyryn — und in noch höherem Maße bei Zusatz von Estern, welche keine Komponente mit den natürlichen Fetten gemein haben, — der Lipase Gelegenheit geben, auf ein Substrat einzuwirken, dem gegenüber sie sich noch nicht durch Anhäufung der Spaltprodukte erschöpft hat.

d) Tributyrin als Substrat. 1. Anwendung zur Lipaseermittlung im Blut und im Magensaft. Wollen wir die lipolytische Wirkung des Blutes an den gewöhnlichsten natürlichen Neutralfetten ermitteln, so steht dem der Umstand hindernd im Weg, daß hier die nämliche Reaktion zwischen dem im Blut nach reichlichem Fettgenuß oder im Hunger, infolge der Mobilisierung von Organfett (Abderhalden, loc. cit.), schon vorhandenen Fett und der Serolipase vorausgegangen ist, so daß dem neu einsetzenden Vorgang von vornherein Hemmungskörper, für welche eine Eliminiervorrichtung im Reagenzglas nicht existiert, entgegenstehen. So ist es denn begreiflich, daß erst die allen anderen Verfahren an Empfindlichkeit weit überlegene Methode von Michaelis und Rona (loc. cit.) eine Spaltung von Neutralfett im Blut erkennen ließ, wodurch die Annahme einer besonderen Monobutyryrinase überflüssig erscheint. Als Neutralfett verwenden Michaelis und Rona das Tributyrin, d. h. also den dem Monobutyryn entsprechenden neutralen Ester aus Buttersäure und Glycerin:



Die Herstellung der Tributyrinlösungen, die Mischung mit der Fermentlösung und dem Phosphatgemisch sowie die Bestimmung selbst erfolgen genau in derselben Weise, wie dies für die Ausführung der

¹⁾ Melis-Schirru, Clin. med. ital. 45 (1908) Nr. 6.

Methode mittels Monobutyryn beschrieben worden ist. Es werden dementsprechend 50 ccm der Tributyrinlösung mit $\frac{1}{2}$ ccm Serum oder Blut sowie 2 ccm des Phosphatgemisches gründlich geschüttelt und die Tropfenzahl vor und nach dem Aufenthalt im Brutschrank ermittelt. Auch müssen Kontrollen mit gekochtem oder z. B. durch Fluornatrium inaktiviertem Serum angesetzt werden.

Für die Ermittlung der Magenlipase auf demselben Wege hat Davidsohn¹⁾ Verdünnungen des Magensaftes ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$) hergestellt und von diesen 0,5, 0,75 und 1 ccm mit je 60 ccm einer in der angegebenen Weise hergestellten gesättigten Tributyrinlösung und je $\frac{1}{2}$ ccm $\frac{1}{3}$ mol. primärem und $\frac{1}{3}$ mol. sekundärem Natriumphosphat versetzt. Je nach den bei diesen Verdünnungen erhaltenen Werten würde dann die Reihe der Konzentrationen nach oben oder unten noch erweitert, so daß man eine Verdünnung erreicht, bei der eine Aenderung von ca. 30 Tropfen auf die Stunde kommt. Dem Reaktionsgemisch werden sofort nach der gründlichen Durchmischung und dann von 20 Minuten zu 20 Minuten Proben entnommen und die Tropfenzahl im Stalagmometer bestimmt.

2. Anwendung zur Unterscheidung von Magenlipase und Pankreaslipase. Da für die Magenlipase und die Pankreaslipase ein ungleiches Optimum für die Azidität des Mediums besteht, nämlich für Pankreaslipase bei $p_H = 8$, für die Magenlipase bei $p_H = 5$, für ein Gemisch von beiden $p_H = 6,5$, so läßt sich hierauf nach Davidsohn²⁾ eine Methode zur Unterscheidung von Magen und Pankreaslipase gründen, was bei der schon erwähnten fast unmöglichen Feststellung, ob am Magensaft beobachtete lipolytische Wirkungen diesem selbst oder regurgitiertem Pankreassaft zuzuschreiben sind, eine wertvolle Ergänzung jener Methoden bildet. Davidsohn stellt sich drei verschiedene Tributyrinlösungen her, deren Azidität den drei erwähnten Optima entspricht. Die Tributyrinlösung wird durch Schütteln von 5–10 Tropfen Tributyrin mit 1 Liter destilliertem Wasser und Filtration der Lösung gewonnen. Zu 70 ccm der letzteren werden 5 ccm der $\frac{1}{3}$ molekularen sekundären Natriumphosphatlösung gefügt, während 5 Minuten kräftig geschüttelt und filtriert. Diese Lösung entspricht der Azidität $p_H = 8$ –8,5. Zur Herstellung der Lösung vom Aziditätsgrad $p_H = 5,5$ werden 70 ccm der Tributyrinlösung mit 5 ccm der $\frac{1}{3}$ molekularen primären Natriumphosphatlösung in der gleichen Weise wie bei der vorigen Lösung behandelt. Eine dritte Lö-

¹⁾ Davidsohn, Berliner klin. Wochenschr. 49 (1912) 1132.

²⁾ Davidsohn, Biochem. Zeitschr. 49 (1913) 249.

sung wird durch Versetzen von 70 ccm Tributyrinlösung mit 4 ccm $\frac{1}{3}$ molekularem primärem Natriumphosphat und 2 ccm $\frac{1}{3}$ molekularem sekundärem Natriumphosphat auf die Azidität $p_H = 6,5$ gebracht und wiederum gleich wie die beiden anderen Lösungen behandelt. Danach werden alle drei Lösungen im Traubeschen Stalagmometer auf ihre Tropfenzahl geprüft und eventuell, wenn sich bei mehrmaliger Prüfung verschiedene Resultate ergeben, nochmals kräftig durchgeschüttelt. Dann wird die notwendige Fermentverdünnung, wie dies früher angegeben wurde, aufgesucht, dieselbe Fermentmenge zu allen drei Proben gesetzt und in Intervallen von 20 Minuten die Tropfenzahl ausgezählt. Nimmt hierbei der Tropfenumsatz von der alkalischen Lösung 1 zu der sauren Lösung 2 ab, so handelt es sich um Pankreaslipase, während bei umgekehrter Reihenfolge die Magenlipase vorliegt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Lipasen erfolgt der Ablauf der Spaltung unregelmäßig.

e) Amylsalizylat und andere Ester, die keine Fettkomponente enthalten als Substrat und die Frage der Spezifität ihrer Esterasen. Ueber das die Hydrolyse des Amylsalizylats bedingende Prinzip, die Amylsalizylase¹⁾, sind die Angaben noch recht schleierhaft und selbst widersprechend, was mit Rücksicht auf die fermentschädigenden Wirkungen der Salizylsäure bei den mit verschiedenen Esterkonzentrationen angestellten Versuchen und dementsprechend variierenden Mengen der in Freiheit gesetzten Salizylsäure auch nicht zu verwundern ist.

Ein Enzympräparat von starkem Aufspaltungsvermögen gegenüber dem Salizylsäureamylester kann nach der Vorschrift von Magnus²⁾ durch Zerreiben von fein gehackter Rindsleber mit Quarzsand, doppelter Extraktion mit physiologischer Kochsalzlösung (9‰), die mit Toluol gesättigt worden ist, Kolieren oder Abzentrifugieren des erhaltenen Extraktes gewonnen werden. 100 ccm dieses Saftes werden dann nach Rosell³⁾ mit Uranylacetatlösung gefällt. Nach dem Neutralisieren

¹⁾ Siehe über Amylsalizylase sowie das Prinzip der fermentativen Salospaltung: Nencki, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmacol. 20 (1886) 367; Lüdy, Ebenda 25 (1889) 347; Willenz, Chem.-Ztg. 11 (1887) 1497; Chanoz u. Doyon. Journ. Physiol. Pathol. 2 (1900) 695; Nobécourt u. Merklen, Soc. Biol. 53 (1901) 148; Doyon u. Morel, Ebenda 55 (1903) 682; Lambert, Contribution à l'étude de l'action biol. du rein, Thèse de Lille, 1903; Malys Jahrbücher (1903) 1068; Pozzi-Escot, Compt. rend. 136 (1903) 1146; Magnus, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42 (1904) 149; Higuchi, Biochem. Zeitschr. 17 (1909) 53.

²⁾ Magnus, loc. cit. vorige Fußnote.

³⁾ Rosell, Nachweis und Verbreitung intrazellulärer Fermente, Dissertation, Straßburg 1901.

mit gesättigter Soda- und Natriumphosphatlösung wird bis zum Ausbleiben eines Niederschlags von der letzteren zugesetzt, filtriert, der Niederschlag mit 100 ccm der physiologischen Kochsalzlösung während 20 Stunden sich selbst überlassen und wieder filtriert. Hierauf fügt man bis zum Auftreten einer schwachen Trübung $n/20$ -Schwefelsäure und bis zum beginnenden Verschwinden derselben wieder $n/20$ -Natronlauge hinzu und konserviert die neutrale Lösung durch Toluolzusatz bis zum Ansetzen des Versuchs. Hierzu werden 20 ccm der Flüssigkeit mit 1 ccm Salizylsäureamylester und überschüssigem Toluol während 4 Tagen im Brutschrank von 37° gehalten, danach das Ferment durch Aufkochen zerstört, filtriert, das Filtrat durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure von eventuell noch vorhandenem Eiweiß befreit, bis zur schwach alkalischen Reaktion Soda hinzugefügt, auf dem Wasserbad eingedampft, der dicke Sirup mit 96%igem Alkohol extrahiert, filtriert, das Filtrat auf dem Wasserbad von Alkohol befreit, der mit Wasser versetzte Rückstand mit Schwefelsäure angesäuert und mit Aether ausgeschüttelt. Diesorgfältig¹⁾ im Scheidetrichter abgetrennten Aetherextrakte werden vereinigt, abfiltriert und nach dem Abdestillieren des Aethers die Salizylsäure mittels ihrer Violettfärbung durch Eisenchlorid oder durch ihren Schmelzpunkt von 155° festgestellt.

Daß auch bei der sog. Amylsalizylase eine Beziehung zur Lipase besteht, zeigt die interessante, von Loevenhart²⁾ aufgefundene Tatsache, daß gallensaure Salze als Aktivator der Amylsalizylase fungieren können, wohl unter denselben Bedingungen, wie sie für die lipolytischen Wirkungen bestehen. Eine Zugänglichkeit des Enzyms für den aktivierenden Einfluß der gallensauren Salze finden wir geradeso wie bei der lipolytischen Wirkung im engeren Sinn, im allgemeinen auch bei dem sonstigen Esterspaltungsvermögen des Pankreassaftes, und im wesentlichen auf dieses Sekret beschränkt³⁾; denn das Leber-

¹⁾ Zur Vermeidung des Mitreißens der wäßrigen Schicht, welche die die Eisenchloridreaktion der Salizylsäure hemmende Schwefelsäure enthält.

²⁾ Loevenhart, Journ. Biol. Chem. 2 (1907) 391.

³⁾ Damit ist allerdings eine Angabe von Morel u. Terroine, Journ. Physiol. Pathol. gén. 14 (1912) 58, wonach Pankreassaft auf die nahe verwandten Methylester der Salizylsäure und Benzoesäure und den Aethylester der Mandelsäure nur sehr schwache Wirkungen ausübt, nur schwierig zu vereinigen, und nach Chanoz und Doyon (loc. cit.) würden sogar Pankreas wie Serum keine spaltenden Wirkungen gegenüber dem Amylester der Salizylsäure selbst besitzen. Diesen Angaben gegenüber haben jedoch Gerard u. Leroy, Journ. Pharm. Chim. [7] 5 (1912) 329, bei den verschiedensten aromatischen Estern Spaltung sowohl durch Darmextrakt wie durch die Mischungen desselben mit Pankreassaft beobachtet.

enzym soll sogar umgekehrt durch gallensaure Salze gehemmt¹⁾ werden.

Immerhin würde durch das Versagen der Aktivierbarkeit durch gallensaure Salze bei der Spaltung des Aethylbutyrats eine Trennungslinie nach der Gruppe der einfachsten Ester hin gezogen. Doyon und Morel²⁾ haben dies zwar bestritten. Nach ihnen ist die Amylsalizylase als ein allgemeines esterspaltendes Ferment zu betrachten, da diese Forscher von der Essigsäure an, an deren Ester (Essigäther) schon Heritsch³⁾ die Spaltung durch Pankreassaft festgestellt hat, bis zur Kaprylsäure die Ester durch dasselbe zu zerlegen vermochten. Ebenso ungewiß ist es, ob für diese letzteren noch besonders eingestellte Esterasen existieren, die zu den echten Lipasen etwa in demselben Verhältnis stehen würden, wie die einfache Amide zerlegenden Amidasen zu den proteolytischen Enzymen. Um scharfe Abgrenzungen handelt es sich nach Loevenhart⁴⁾ bei den spaltenden Agenzien der verschiedenen Estergruppen nicht. Man könnte die in diesem Gebiet vorliegenden Verhältnisse vielleicht am ersten den Verwandtschaftsreaktionen der Immunochemie vergleichen. Es bildet sich für ein bestimmtes Sekret oder ein bestimmtes Organ diejenige Esterase aus den vorhandenen Anlagen heraus, die dem am häufigsten zu verarbeitenden Substrat am besten angepaßt ist. Zugleich tritt die Reaktion aber auch gegenüber anderen Estern, nach Maßgabe ihrer Verwandtschaft, in Kraft. So wird Essigester von Pankreassaft viel schwächer angegriffen als die höheren Ester⁵⁾ und wie Terroine⁶⁾ zeigte, fällt die Spaltungsgeschwindigkeit durch pankreatische Lipase vom Triazetin zum Diazetin und von diesem zum Monazetin unter sonst gleichen Bedingungen. Die nähere oder entferntere Beziehung zu dem Neutralfett, dessen Spaltung dem Pankreassaft am häufigsten obliegt und auf die er sich daher eingestellt hat, kommt darin deutlich zum Ausdruck.

Was die Reaktionsbedingungen anbetrifft, so ist die Hydroxylionenkonzentration von größtem Einfluß. Das Optimum befindet sich bei $\frac{1}{150}$ -normaler Natron-

¹⁾ Loevenhart u. Souder, Journ. Biol. Chem. 2 (1907) 415; Loevenhart, Ebenda 2 (1907) 427.

²⁾ Doyon u. Morel, loc. cit. Fußnote 1, Seite 493.

³⁾ Heritsch, Zentralbl. med. Wissensch. (1875) 449.

⁴⁾ Loevenhart, Journ. Biol. Chem. 2 (1907) 427.

⁵⁾ Kastle, Loevenhart u. Elvove, Amer. Chem. Journ. 24 (1900) 491, 27 (1902) 481, 31 (1904) 521; Chem. News 83 (1901) 64.

⁶⁾ Terroine, Biochem. Zeitschr. 23 (1910) 404, 429; Morel u. Terroine, loc. cit. Fußnote 3, vorige Seite.

lauge. Fettsäuren bzw. deren Seifen wirken als Spaltprodukt hemmend, nicht aber Glycerin, bei dem die schon erwähnte Ueberkompensation stattfindet durch Einflüsse physikalischer Natur auf die Reaktionsbegünstigung. Salze wirken, je nach ihrer Natur und ihrer Konzentration, in beschleunigendem oder verzögerndem Sinn. Am stärksten aktivieren, gemäß den früheren Ausführungen, die gallensauren Salze, die zudem noch die merkwürdige Eigentümlichkeit zeigen, das Gleichgewicht zu verschieben. Vielleicht hängen diese beiden Einflüsse zusammen, indem an den stärkeren Wirkungen der aktivierten Lipase auch die anormale Verschiebung des Gleichgewichts zwischen abbauender und aufbauender Reaktion in erhöhtem Maße zur Geltung kommt, von welcher noch die Rede sein wird.

Am regellosesten scheinen sich die esterspaltenden Prinzipie des Blutes und der Organe zu verhalten. Wie sehr hier die ganze Sache noch der Klärung bedarf, zeigen die Angaben von Saxl¹⁾, welcher eine Zersetzung von Monobutyryn wie von Monazetin und zum Teil von Aethylbutyrat durch Serum und Organextrakte überhaupt nicht wahrnehmen konnte, während er für das Amylsalizylat leichte Spaltbarkeit angibt.

Vielleicht handelt es sich in solchen Fällen nicht sowohl um eine Anpassung des Enzyms an das zu spaltende Molekül, wie um eine Anpassung an die Stärke und sonstige Qualitäten der bei der Hydrolyse in Freiheit gesetzten Säure. Käme ein nur an die schwächeren, hochmolekularen Fettsäuren gewöhntes und daher erheblich säureempfindliches Enzym²⁾ bei der Spaltung eines niedrigen Esters mit der daraus hervorgehenden stärkeren Säure in Berührung, so würde es hierdurch eine solche Schädigung erfahren, daß damit die schwächere Wirkung gegenüber den niedrigen Estern verständlich erscheinen könnte.

Euler³⁾ hält es für möglich, daß die Abweichungen von der monomolekularen Reaktionsgleichung, welche die genannten Forscher bei der Einwirkung von Organlipasen auf Aethyl-butyryl-erhielten, ebenfalls durch die Säureempfindlichkeit der Lipase bedingt sind⁴⁾.

Mit der Säureempfindlichkeit der Lipase würde ferner der Befund von Kastle⁵⁾ in Einklang stehen, daß nicht die alkoholische,

¹⁾ Saxl, Biochem. Zeitschr. 12. (1908) 343.

²⁾ Kastle u. Loevenhart, Amer. Chem. Journ. 24 (1900) 491; Kastle, Johnston u. Elvove, Ebenda 31 (1904) 521.

³⁾ Euler, Allg. Chemie der Enzyme, Wiesbaden 1910, S. 106.

⁴⁾ Bei Esterasen aus Fettgewebe vom Schwein konnte Euler, Hofmeisters Beitr. 7 (1905) 1, bei dem nämlichen Substrat Gültigkeit der monomolekularen Formel nachweisen und dasselbe fanden Bodenstein u. Dietz, Zeitschr. f. Elektrochem. 12 (1906) 605; Dietz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52 (1907) 279, sowie Taylor.

⁵⁾ Kastle, U. S. Public Health and Mar. Hosp. Service 1906, Bull. Nr. 26, S. 48; Biochem. Zentralbl. 5, 1181.

sondern die Säurekomponente für das ungleiche Verhalten ein und desselben Enzyms gegenüber verschiedenen Estern maßgebend ist. Auch der Grad der Schädigung, welche die Esterasen durch Temperaturerhöhung und durch Fluornatrium bzw. das Fluorion erfahren, variiert mit dem Substrat. Beide Faktoren schädigen die Wirkung gegenüber Aethylbutyrat und Aethylazetat¹⁾ in weit höherem Maße als diejenige gegenüber Olivenöl z. B., und ganz allgemein wächst die Schädigung mit dem Sinken des Molekulargewichts eines Esters. Es rührt dies vielleicht daher, daß die Bindung zwischen dem Enzym und dem Estermolekül, welche das Enzym hier wie in anderen Fällen²⁾, z. B. bei der Diastase, vor der Schädigung schützt, um so lockerer ist, je einfacher die Konstitution³⁾ des Esters.

Die Hemmungswirkung des Fluornatriums hat sogar analytische Verwendung gefunden, da Amberg und Loevenhart⁴⁾ dieselbe für den Nachweis von Natriumfluorid in Nahrungsmitteln benutzen. Auch für den Nachweis im Blut bzw. im Plasma kommt dieser originellen Methode Bedeutung zu, da es gerade bei der Prüfung des fermentativen Verhaltens eines zur Untersuchung vorliegenden Plasmas nicht gleichgültig ist, ob das Blut nach dem Vorschlage von Arthus⁵⁾ durch einen Natriumfluoridzusatz ungerinnbar gemacht worden ist. Dagegen spielt bei dem in der Pferde- und Rinderleber⁶⁾ sowie in den Blutkörperchen⁷⁾ festgestellten spaltenden Einfluß gegenüber Cholesterinester das Fluornatrium offenbar keine hemmende Rolle, wohl infolge des besonders hohen Molekulargewichtes des Cholesterins und seiner Verbindungen. Hier wird nach der Methode von J. H. Schultz⁸⁾ die frische, durch die Fleischhackmaschine gegebene Pferde- oder Rinderleber mit 1%iger Fluornatriumlösung sowie etwas 10%iger Thymollösung gründlich vermischt und während 2mal oder 3mal

¹⁾ Aeußerst geringe Fluornatriumkonzentrationen (1 : einer Milliarde) zeigen die so häufig (bei fast allen Medikamenten) beobachtete Umkehrung, indem solche Spuren die Wirkung des Enzyms begünstigen; Loevenhart u. Peirce, Journ. Biol. Chem. 2 (1907) 397.

²⁾ Loc. cit. im *Allg. Teil*.

³⁾ Für das Fluornatrium wird allerdings angegeben, daß es keine Fermentschädigung, sondern nur eine Verzögerung der Einstellung des Gleichgewichts bedinge.

⁴⁾ Amberg u. Loevenhart, Journ. Biol. Chem. 4 (1908) 149.

⁵⁾ Arthus, Journ. Physiol. Pathol. 3 (1901) 887.

⁶⁾ Kondo, Biochem. Zeitschr. 26 (1910) 243, 27 (1910) 427; Schultz, loc. cit. nächstfolgende Fußnote.

⁷⁾ Cytronberg, Biochem. Zeitschr. 45 (1912) 281.

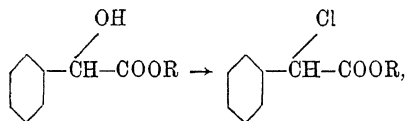
⁸⁾ J. H. Schultz, Biochem. Zeitschr. 42 (1912) 255.

24 Stunden im Brutschrank belassen. Prinzip der Methode ist die Ermittlung der Cholesterin- und Cholesterinestermengen¹⁾ an zwei gleichen Teilen des Organbreies, wovon die eine Probe sofort, die andere nach 2tägigem Aufenthalt im Brutschrank in Untersuchung genommen wird. Ergibt die Kontrolle einen geringeren Gehalt an Cholesterin als der Hauptversuch, so ist damit die Existenz einer spaltenden Wirkung des Untersuchungsmaterials gegenüber Cholesterinester erwiesen, die man je nach der Auffassungsweise als einen Teileffekt der Lipase oder als den Einfluß eines besonderen Fermentes, der Cholesterinase, betrachten kann.

In eigenartiger, aber völlig durchsichtiger Weise komplizieren sich die Verhältnisse, wenn an Stelle gewöhnlicher Ester Substrate mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen zur Verwendung gelangen.

In solchen Fällen äußert die Esterase vermöge einer eigenen Asymmetrie ein ausgesprochenes Selektionsvermögen für den einen oder anderen optischen Antipoden eines razemischen Esters. Nur diese Form erfährt eine Spaltung, so daß sich, wie Dakin²⁾ beim Mandelsäureester, Warburg³⁾ beim Leuzinester und P. Mayer (loc. cit.) beim Lezithin feststellten, aus dem inaktiven Razemkörper mittels der Lipase die der gespaltenen Komponente entsprechende optisch aktive Säure gewinnen läßt, also z. B. beim inaktiven Lezithin d-Glyzerinphosphorsäure.

Beim Mandelsäureester und Lezithin entsteht durch die asymmetrische Esterspaltung die rechtsdrehende, beim Leuzinester die linksdrehende Form. Durch eine Aenderung in der Konstitution des Moleküls infolge Einführung von Substituenten kann jedoch die leichter spaltbare Razemform in die schwerer spaltbare umgewandelt werden und umgekehrt. So bedingt z. B. der Ersatz des Hydroxyls vom Mandelsäureester durch Halogen



daß nunmehr bei der fermentativen Spaltung der Razemform der rechtsdrehende Ester unangegriffen bleibt, während der linksdrehende Ester gespalten wird und in diesem Fall l-Chlor-phenyl-Essigsäure liefert.

Unter Umständen kann sich der Organismus seiner Esterasen auch zur Entgiftung schädlicher Stoffe bedienen, wie dies z. B.

¹⁾ Windaus, Zeitschr. f. physiol. Chem. 65 (1910) 110.

²⁾ Dakin, Journ. Physiol. 30 (1903) 253, 32 (1905) 199; siehe ferner *Allg. Teil*, S. 513.

³⁾ Warburg, Ber. d. chem. Ges. 38 (1905) 187.

Schmidt¹⁾ beim Methyl- und Aethylester der Morphinglykolsäure durch Lebersaft festgestellt hat. Nach der Berechnung von H. Goldschmidt²⁾ lassen sich die Versuche durch die Gleichung:

$$k = \frac{1}{t \sqrt{F}} \log \frac{a}{a-x}$$

darstellen.

f) Phytase und Chlorophyllase. Endlich mögen an dieser Stelle noch zwei Enzyme, die letzten der hydrolysierenden Fermente, Erwähnung finden. Das eine dieser Enzyme ist die von Mc Collum und Hart³⁾ in Leber und Blut, von Suzuki, Yoshimura und Takaishi⁴⁾ in höheren Pflanzen (Reis, Weizen usw.), von Dox und Golden⁵⁾ in Aspergillusarten aufgefundene Phytase. Da sich die durch dasselbe beschleunigte Reaktion als eine Aufspaltung des Phytins zu Inosit und Phosphorsäure — zu einem Alkohol und einer Säure — darstellt, so findet dieses Enzym seine Stellung im System am zweckmäßigsten bei den Esterasen, vorausgesetzt, daß es sich bei den zugrunde liegenden Beobachtungen — zu denen insbesondere auch diejenigen von Zaleski⁶⁾ über die Bildung von Phosphorsäure aus organischen Phosphorverbindungen bei der Keimung von Pflanzensamen gehören — nicht um einen schon an und für sich so rasch verlaufenden Zersetzungs Vorgang des Phytins handelt, daß sich die Annahme eines beschleunigenden Fermentes erübrigt⁷⁾.

Das zweite dieser Fermente besitzt so einzigartige Eigenschaften, daß man auch hier die Frage stellen kann, ob überhaupt eine eigentliche Fermentwirkung vorliegt. Willstätter und Stoll⁸⁾ fanden als ständigen Begleiter des Chlorophylls, den sie in bei Zimmertemperatur getrocknetem und mit Alkohol gründlich extrahiertem Blattpulver erhalten konnten⁹⁾, ein von ihnen als Chlorophyllase bezeichnetes, dem Schützschens Gesetz folgendes Agens, welches

¹⁾ Schmidt, Ueber eine Entgiftung und Abspaltung der Methyl- und Aethylgruppe im Organismus, Dissert., Heidelberg 1901.

²⁾ Vgl. auch die Arbeiten von H. Goldschmidt, Zeitschr. f. physik. Chem. **31** (1899) 235.

³⁾ Mc Collum u. Hart, Journ. Biol. Chem. **4** (1908) 497.

⁴⁾ Suzuki, Yoshimura u. Takaishi, Bull. Coll. Agricult. Tokio **7** (1907) 495.

⁵⁾ Dox u. Golden, Journ. Biol. Chem. **10** (1911) 183.

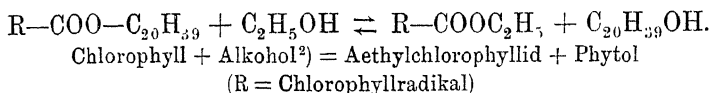
⁶⁾ Zaleski, Ber. d. bot. Ges. **24** (1906) 285.

⁷⁾ Siehe Ilgorow, Biochem. Zeitschr. **42** (1912) 432.

⁸⁾ Willstätter u. Stoll, Ann. Chem. **378** (1910) 18, **380** (1911) 148.

⁹⁾ Die Chlorophyllase bleibt im Blattpulver zurück.

den mit dem Chlorophyll veresterten Alkohol, das Phytol $C_{20}H_{39}OH$ abzuspalten vermag (Temperaturoptimum 25°), und zwar nicht in wäßriger, sondern in alkoholischer Lösung (80—90 % Alkohol)¹⁾ — entsprechend der Gleichung:



Die Reaktion ist — wie die Pfeile zeigen — umkehrbar, jedoch gelingt ein Ersatz des Alkohols durch Phytol nur zu 10 % und bei Gegenwart von etwas Wasser.

Die fermentative Estersynthese.

Den erwähnten fermentativen Spaltungen gegenüber stehen die fermentativen Synthesen, die im Gebiet der Esterasen im weitesten Sinn von nicht zu unterschätzender Bedeutung sind. Denn hier sind die Spaltprodukte mehr oder weniger leicht wasserlöslich und neigen daher — gerade im Gegensatz zum Ausgangsmaterial — besonders dazu im Reaktionsgemisch zu verbleiben.

Daß zwischen der Wasserlöslichkeit der als Spaltprodukte auftretenden Fettsäuren und ihrer Neigung zur Resynthese der entsprechenden Fette eine enge Beziehung besteht, zeigt das Verhalten von Oelsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure. Die am leichtesten lösliche Oelsäure gibt nach Hamsik³⁾ die stärkste, die am schwersten lösliche Stearinsäure die schwächste Resynthese. Die hochmolekularen Säuren, die als Spaltprodukt der Wachsplättchen von Philänuslarven unter dem Einfluß ihres eigenen Sekretes auftreten⁴⁾, dürften ihrer Natur nach schwer löslich und daher ungeeignet zur Resynthese sein.

Hemmungen der Spaltung, wie sie Kastle, Johnston und Elvove⁵⁾ bei der Einwirkung der Lipase aus Schweineleber auf Aethylbutyrat durch die gebildete Buttersäure beobachteten und für die Abweichungen vom monomolekularen Reaktionsverlauf verantwortlich machten⁶⁾, sind eine notwendige Begleiterscheinung des Verbleibens der Spalt-

¹⁾ Da der 80 %ige Alkohol besser wirkt als der 90 %ige, scheint ein Einfluß des Wassers doch beteiligt zu sein.

²⁾ Auch mit Methylalkohol läßt sich die Alkoholyse durchführen, jedoch weniger glatt als mit Aethylalkohol.

³⁾ Hamsik, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71 (1911) 238.

⁴⁾ Siehe Sulc, Biol. Listy (1912) 69; Biochem. Zentralbl. 13, 2274.

⁵⁾ Kastle, Johnston u. Elvove, Journ. Amer. Chem. Soc. 31 (1904) 521.

⁶⁾ Die erwähnten Forscher fanden eine Abnahme der Konstanten bei Berechnung für eine monomolekulare Reaktion, während anderseits H. Euler, Hof-

produkte im Reaktionsgemisch. Hier sind daher auch die ersten Beobachtungen reversibler Fermentwirkungen zu verzeichnen, so die allerdings später von Moore¹⁾ bestrittene, von Hamsik²⁾ jedoch ebenfalls beobachtete³⁾ Fettsynthese aus den Komponenten, welche Ewald⁴⁾ unter dem Einfluß von Darmschleimhaut festgestellt hat; die von Hanriot⁵⁾ aufgefundene Monobutyribildung aus Glycerin und Buttersäure; die Synthese von Neutralfett (Triolein) mittels tierischer Lipase durch Pottevin⁶⁾, mittels pflanzlicher Lipase⁷⁾ durch Taylor⁸⁾, Welter⁹⁾, Iwanow¹⁰⁾ und Jalander¹¹⁾; die Bildung von Estern (Pottevin), die mit den Fetten entweder die alkoholische Komponente¹²⁾ oder die Fettsäure¹³⁾ teilen; die von Kastle, Loevenhart und Elvove¹⁴⁾

meisters Beitr. 7 (1905) 1. bei der Lipase aus Schweinefett gegenüber demselben Substrat, Ebsen, Biochem. Zeitschr. 33 (1911), 413, 39 (1912) 21; Dissert., Berlin 1912, bei der Spaltung von Tributyrin durch Kaninchenblut und Taylor, Journ. Biol. Chem. 2 (1906) 87, bei der Einwirkung von Rizinuslipase auf Triazetin die monomolekulare Reaktionsgleichung gültig fanden. Auch bei Berechnung der Versuchsergebnisse, welche Zellner bei der Wirkung von Phytolipase des Fliegen-schwamms auf Olivenöl erhalten hatte, fand Arrhenius diese Formel gültig. Desgleichen Nicloux (loc. cit.) bei Rizinuslipase. R. O. Herzog in Oppenheimer, Fermente 2 (1913) 1022, hat demgegenüber die Versuche von Kastle, Johnston und Elvove (loc. cit.) durch die Differentialgleichung:

$$\frac{dx}{dt} = k(a - x)^{\frac{3}{2}}$$

bzw. deren Integral:

$$\frac{1}{\sqrt{a-x}} - \frac{1}{\sqrt{a}} = kt$$

darstellen können.

¹⁾ Moore, Proc. Royal Soc. London [Ser. B] 72 (1903) 134.

²⁾ Hamsik, Zeitschr. f. physiol. Chem. 59 (1909) 1.

³⁾ Wenigstens an der Darmschleimhaut vom Pferd, Schaf und Schwein waren die Resultate positiv, negativ dagegen bei der Rinder- und Hundedarmschleimhaut.

⁴⁾ Ewald, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1883) Suppl. 302.

⁵⁾ Hanriot, Compt. rend. Soc. Biol. 33 (1901) 70.

⁶⁾ Pottevin, loc. cit. dieses Kapitel und *Allg. Teil*.

⁷⁾ Rizinuslipase.

⁸⁾ Taylor, Univers. California Public. (1904) I, 33.

⁹⁾ Welter, Zeitschr. f. angew. Chem. 24 (1911) 385.

¹⁰⁾ Iwanow, Ber. d. bot. Ges. 29 (1911) 595.

¹¹⁾ Jalander, Biochem. Zeitschr. 36 (1911) 435, 473.

¹²⁾ So wurden Glycerinester der Essigsäure und Propionsäure von Pottevin dargestellt.

¹³⁾ Amylester der Stearinsäure, Methylester der Oelsäure.

¹⁴⁾ Kastle, Loevenhart u. Elvove, Amer. Chem. Journ. 24 (1900) 491, 27, 481, 31, 521; siehe ferner im *Allg. Teil*.

festgestellte Aethylbutyratsynthese aus Aethylalkohol und Buttersäure, die auch Mohr¹⁾ sowie Bodenstein und Dietz²⁾ erhalten und auf die Bildung eines analogen Esters (Amylbutyrat) übertragen konnten. Zu den aus dem Massenwirkungsgesetz zu folgernden Umständen, welche die Fett- und allgemein die Estersynthese begünstigen, gehört außer den schon genannten auch der von Pottevin (loc. cit.) und Bradley³⁾ geforderte möglichst vollständige Wasserausschluß.

Trotzdem Pottevin bei tierischen Lipasen den Ausschluß von Wasser als notwendig erachtet, scheint nach den Beobachtungen von Jalander (loc. cit.) unter den allerdings etwas anderen Verhältnissen der Phytolipasen eine geringe Menge Wasser nicht nur nicht schädlich zu sein, sondern sogar die Synthese zu fördern — einer der vielen Fälle also, wo Wasser als positiver Katalysator fungiert (siehe *Allg. Teil*). Offenbar lagern sich hier zwei entgegengesetzte Einflüsse des Wassers, der negative nach dem Massenwirkungsgesetz und der positiv katalytische übereinander, und anfänglich überwiegt dieser letztere. Die günstige Wirkung des Wassers kann auch eine indirekte sein, indem dieses der irreversiblen Schädigung entgegenwirkt, welche nach Jalander Triolein und Rizinusöl auf die Rizinuslipase ausüben.

Außerdem ist die Reaktion des Mediums hier wie bei den reversiblen diastatischen Wirkungen von Einfluß. Hanriot (loc. cit.) gibt an, daß in neutraler Lösung die Spaltung von Glycerinester, in saurer Lösung die Gegenreaktion (Monobutyrimbildung) überwiegt. Demgegenüber hat Hamsik⁴⁾ in salzsaurer Lösung Hemmung der Fettsynthese, in schwach alkalischer Begünstigung der Spaltung beobachtet. Dies braucht jedoch nicht unbedingt ein Widerspruch zu sein, da es sich bei den Versuchen von Hamsik um das Ueberschreiten der mit der untersuchten Fermentmaterie wechselnden, fördernden Aziditätsgrenze gehandelt haben kann. Stärkere Säurekonzentrationen beeinflussen ja jede andere fermentative Wirkung als diejenige des Pepsins in negativem Sinne, und für die Lipasen ist die schädigende Wirkung höherer Säurekonzentrationen, so z. B. für Essigsäure (von $n/10$ an)⁵⁾ erwiesen, wenn auch durch weitgehende Anpassung an das Auftreten der spezifischen sauren Spaltprodukte eines Substrates, an welche die Lipase angepaßt ist⁶⁾ oder an die

¹⁾ Mohr, Wochenschr. f. Brauerei 19 (1902) 588.

²⁾ Bodenstein u. Dietz, Zeitschr. f. Elektrochem. 12 (1906) 605; Dietz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52 (1907) 279.

³⁾ Bradley, Journ. Biol. Chem. 8 (1910) 251, gibt an, daß bei 50% Wasser eine Synthese vollständig verunmöglicht wird.

⁴⁾ Hamsik, Zeitschr. f. physiol. Chem. 65 (1910) 232

⁵⁾ Jalander, Biochem. Zeitschr. 36 (1911) 435.

⁶⁾ Wie weit diese Anpassung geht, zeigt die Beobachtung von Sommer-

Reaktion des Mediums, in dem sich ihre Wirkung normalerweise vollzieht, die Empfindlichkeitsgrenze hinaufrücken kann. Jedenfalls würde eine Bestätigung der Angaben, daß sich spaltende und synthetisierende Funktion der Lipase bei ungleicher Reaktion des Mediums vollzieht (oder daß zum mindesten ungleiche Hydroxyl- bzw. Wasserstoffionen-optima für den Ablauf der Reaktion in den beiden entgegengesetzten Richtungen bestehen), die Brücke bilden zu der eigentümlichen Annahme von Euler ¹⁾, daß spaltende und synthetisierende Fermentmoleküle verschieden seien. In der Tat kann ja jede Veränderung im Auflockerungszustand solcher Moleküle, wie dies die Wechselwirkung zwischen Kolloid und irgendwelchen entgegengesetzt geladenen Ionen mit sich bringt — seien es Wasserstoff- und Hydroxylionen oder Kationen und Anionen von Salzen — als eine Ungleichheit gedeutet werden. Solche Aenderungen können vielleicht auch geeignet sein, um Anomalien zu erklären, wie sie unter anderem bei der Lipasewirkung zur Geltung kommen. So ist eine eigenartige, nach den Ausführungen im letzten Kapitel des *Allgemeinen Teils* unerwartete, Gleichgewichtsverschiebung gegenüber der unkatalysierten oder durch Säuren katalysierten Reaktion von Taylor ²⁾ bei der Einwirkung von Rizinuslipase auf Triazetin, sowie von Dietz und Bodenstein ³⁾ bei der Spaltung von Amylbutyrat durch eine Suspension aus Schweinepankreas festgestellt und eingehend studiert worden. Die letztgenannten Forscher erhielten die folgenden Werte für die Gleichgewichtskonstante bei verschiedenen Konzentrationen:

Konzentration	Gleichgewichtskonstante K
0,20 normal	1,12
0,10 „	0,74
0,05 „	1,12

Die Berechnung ergibt demgegenüber für:

$$K = \frac{C_{\text{Amylbutyrat}} \cdot C_{\text{H}_2\text{O}}}{C_{\text{Amylalkohol}} \cdot C_{\text{Buttersäure}}} = 1,96.$$

Dietz und Bodenstein stellen sich das gequollene Ferment selbst als Reaktionsort vor, wobei es nicht allein zu einer Verteilung der Stoffe zwischen diesem und der Lösung kommen würde, sondern

ville, Biochem. Journ. 6 (1912) 203, daß sich mittels der Rizinuslipase bis 85 % freie Fettsäure aus dem Oel gewinnen läßt.

¹⁾ Euler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52 (1907) 146.

²⁾ Taylor, Journ. Biol. Chem. 2 (1906) 87; siehe auch Derselbe, Zeitschrift f. physik. Chem. (Jubelband für Arrhenius) 69 (1909) 585.

³⁾ Bodenstein u. Dietz, Zeitschr. f. Elektrochem. 12 (1906) 605.

zugleich zu einer Adsorption an das Ferment, was sie durch Einführen des Exponenten $^{1/2}$ in die Geschwindigkeitsgleichung:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 (a - x) - k_2 x$$

zur Darstellung bringen, in welcher Gleichung x die zur Zeit t entstandene Estermenge (bzw. die verbrauchte Säuremenge), a die Anfangskonzentration der Säure, k_1 den Geschwindigkeitskoeffizienten der Esterbildung, k_2 denjenigen der Esterzersetzung bedeuten. Die erwähnte Geschwindigkeitsgleichung nimmt dabei die Form an:

$$\frac{dx}{dt} = k_1' (a - x) - k_2' \cdot x^{1/2}.$$

Hieraus ergibt sich:

$$k_1' = \frac{1}{t} \cdot \frac{2a}{a - \xi} \left(\frac{\xi}{a} \cdot \log \frac{\sqrt{\xi}}{\sqrt{\xi} - \sqrt{x}} + \log \frac{a}{\sqrt{x \cdot \xi} + a} \right)$$

$$k_2' = \frac{1}{t} \cdot \frac{2\xi \sqrt{a - \xi}}{2a - \xi} \cdot$$

$$\left(\log \frac{\sqrt{a} - \sqrt{a - \xi}}{\sqrt{a - x} - \sqrt{a - \xi}} + \frac{a - \xi}{a} \cdot \log \frac{\sqrt{a - \xi} \cdot \sqrt{a + a}}{\sqrt{a - \xi} \cdot \sqrt{a - x} + a} \right).$$

Die Beziehung zwischen der Fermentquantität F und der Reaktionsgeschwindigkeit konnten Bodenstein und Dietz, wiederum unter Berücksichtigung der adsorbierenden Wirkung der Lipase, durch die Gleichung:

$$\frac{dx}{dt} = F [k_1 (a - x) k_2 \cdot x^{1/2}]$$

zur Darstellung bringen.

Nach Peirce¹⁾ würde es sich nicht um eine physikalische Adsorption, sondern um eine intermediär auftretende chemische Verbindung zwischen Lipase und Ester handeln, wie dies ja im allgemeinen für die erste Phase der Enzymwirkungen angenommen wird. Eine chemische Bindung würde natürlich nicht in Widerspruch stehen zu der Theorie einer physikalischen Adsorption, sondern könnte vielmehr als die nächste Folgeerscheinung der ersten adsorptiven Phase betrachtet werden. Peirce gründet die Annahme einer chemischen Bindung auf seine Spaltungsversuche von Aethylbutyrat durch die Lipase aus Schweineleber. Bei bestimmtem Volumen der Lösung, bestimmter Azidität derselben und bestimmter Substratquantität erwies sich die zum Umsatz der letzteren erforderliche Zeit als umgekehrt proportional der Fermentkonzentration. War die Konzentration des

¹⁾ Peirce, Journ. Amer. Chem. Soc. 32 (1910) 1517.

Fermentes bestimmt, so ergab sich für die Umsatzzeit Abhängigkeit von der Säurekonzentration, nicht aber von der Estermenge, von der sie sich bei einer höheren Esterkonzentration als $\frac{1}{200}$ normal als unabhängig erwies. Diese Beobachtungen ließen sich mit dem Massenwirkungsgesetz unter der Annahme vereinigen, daß bei Esterkonzentrationen höher als $\frac{1}{200}$ normal der größere Teil des Fermentes das erwähnte Zwischenprodukt mit dem Ester bilde und daß die Menge des entstandenen Zwischenproduktes der Enzym- wie der Esterkonzentration proportional sei. Aus den schon erwähnten Versuchen von Kastle, Johnston und Elvove¹⁾ am selben System hatte sich bei längerer Versuchsdauer die gebildete Estermenge als nahezu konstant ergeben, während sich bei kürzerer Versuchsdauer der Einfluß der Esterkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanter Fermentmenge durch die Duclauxsche Regel $k \cdot C$, wenn C die Esterkonzentration und k die Reaktionsgeschwindigkeit bedeuten, wiedergeben ließ. Mit zunehmender Esterkonzentration nahm also die Geschwindigkeit ab.

Handelt es sich um die Ermittlung der synthetischen Wirksamkeit eines lipaseführenden Materials unter den für eine solche Wirkung optimalen Bedingungen, so kann man in folgender Weise vorgehen. Da Organpreßsäfte nach den Versuchen von Reach²⁾ negative Resultate ergaben, vielleicht infolge ihres Wassergehaltes, so stellt man sich zunächst nach einer der an anderer Stelle angeführten Methoden ein trockenes Organpulver her oder verwendet ein solches käufliches Präparat, so z. B. das Pankreatin. 2 g hiervon werden in zwei 150—200 ccm Kölbchen verbracht, mit 20 g reiner Oelsäure und 60 ccm reinstem Glycerin vermischt und unter Zusatz von wenig Thymol gründlich durchgeschüttelt. Danach werden sofort jedem Kölbchen 5 ccm entnommen, 20 ccm Alkohol hinzugefügt, durch Schütteln gut vermischt und mit $n/10$ -Natronlauge mittels Phenolphthalein als Indikator titriert. Beide Kölbchen werden dann für 1 oder 2 Tage in den Brutschrank gestellt und an wieder herausgenommenen Proben von je 5 ccm in der angegebenen Weise die Titration ausgeführt. Dieselbe Prozedur wird nach weiterem Aufenthalt im Brutschrank (4, 6, 8 Tage) noch mehrmals wiederholt. Eine Abnahme des Säuregrades gegenüber der ersten Probe zeigt dann die stattgefundene Synthese an.

Die Menge des gebildeten Fettes kann auch direkt nach Kötts-

¹⁾ Kastle, Johnston u. Elvove, Journ. Amer. Chem. Soc. 31 (1904) 521.

²⁾ Reach, Zentralbl. f. Physiol. des Stoffwechsels [N. F.] 2 (1907) 769.

refer ermittelt werden. Hamsik¹⁾ verfährt dabei in der Weise, in der je 2,5 ccm Oelsäure, deren Gewicht genau bestimmt wird, je 1 ccm Glycerin, je 1,5 g Wasser und 0,2 g Thymol mit $\frac{1}{2}$ —1 g des prüfenden Organpulvers in Erlenmeyerkölbchen vermischt. Die eine Hälfte der Gemische wird sofort, die andere nach 6tägigem Aufenthalt im Brutschrank auf Fett und Oelsäure untersucht, indem man betreffenden Proben mit je 50 ccm Aether ausschüttelt, die Aetherfraktionen vereinigt, den Aether abdestilliert, 50 ccm Alkohol zu jedem Rückstände setzt und mit halbnormaler alkoholischer Kalilauge zur schwachen Rötung von Phenolphthalein titriert. Hierauf kocht man am Rückflußkühler jede Probe $\frac{1}{2}$ Stunde mit 10 ccm der halbnormalen Kalilauge auf dem Wasserbad und titriert mit halbnormaler Oxalsäure den Laugenüberschuß zurück, der um so geringer ist, je mehr Fett in dem betreffenden Reaktionsgemisch zur Zeit der Verseifung vorhanden war und bei diesem Vorgang die zugesetzte Lauge, entsprechend der Menge der freiwerdenden Oelsäure, bindet. Die Differenz gegenüber der ersten Titration, welche der Ermittlung der noch freien Oelsäure im Reaktionsgemische dient, entspricht der Menge des gebildeten Trioleins.

Anhang zum Abschnitt Hydrolysierende Fermente.

Der Abschnitt über die hydrolysierenden Fermente kann nicht abgeschlossen werden, ohne der grundlegenden modernen Untersuchungen über die Konstitution der höheren Kohlenhydrate zu gedenken, die erst herausgekommen sind, nachdem die betreffenden Abschnitte dieses Buches schon umbrochen waren. Daher konnten sie keine Berücksichtigung in den einschlägigen Kapiteln finden. Es ist dieser Mangel um so fühlbarer, als die in Frage kommenden Arbeiten, so insbesondere diejenigen von Karrer²⁾, eine vollständig neue Einstellung der Forschung zum Problem der Stärke und ihrer Veränderungen, seien sie fermentativer oder anderer Art, erfordern. Ganz besonders wird, außer der Einleitung, das Kapitel dieses Buches von der Neuorientierung betroffen, welches sich mit der Theorie der Diastasewirkung befaßt. Das dort Besprochene bedarf folglich einer entsprechenden Korrektur. Zugleich werden manche noch schwebende Fragen, so diejenige der Einwirkung von Formaldehyd auf Stärke, durch die

¹⁾ Hamsik, Zeitschr. f. physiol. Chem. 59 (1909) 1.

²⁾ Siehe die zahlreichen Arbeiten von Karrer und seinen Mitarbeitern in den Helvetica chim. acta von 1921 bis 1923; vgl. auch im folgenden.

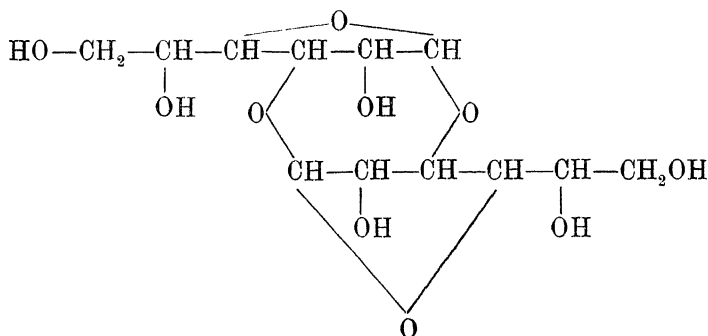
moderne Kohlenhydratforschung in ein neues Licht gerückt. Denn die Auffassung über den Chemismus dieser Wirkungen wird naturgemäß bestimmt durch die Auffassung über die Konstitution der Stärke und den Modus des Spaltungsverlaufes.

Selbstverständlich spielen die betreffenden Konstitutionsfragen auf Schritt und Tritt auch in die Praxis der Diastasebestimmung hinein. Im folgenden seien daher in kurzen Zügen die Ergebnisse der modernen Forschung über die Konstitution von Stärke, Glykogen, Inulin, Zellulose und verwandten Polysacchariden dargelegt:

Die bis vor kurzem herrschende Auffassung gründete sich, wie früher erwähnt, auf die lediglich in der chemischen Tradition wurzelnde Annahme, daß die Stärke aus einer großen Zahl glukosidisch oder ätherartig verknüpfter Hexosemoleküle bestehe. Sie wäre das letzte, hochkomplizierte kolloide Glied einer Kondensationsreihe, die man durch Hydrolyse zunächst in noch kolloide, aber höher disperse Bruchstücke, die Dextrine, und diese weiterhin in Maltose zerlegen würde. Auch sollte eine geringe Menge reduzierender Zucker schon in einem frühen Stadium des hydrolytischen Abbaus neben den Dextrinen entstehen.

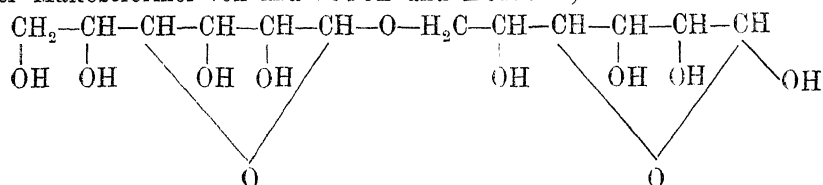
Ganz im Gegensatz zu der früheren Auffassung findet nun Karrer, daß die Stärkemolekel, sowie die Moleküle der durch die abbauende Wirkung des *Bacillus macerans* gewonnenen α -Tetramylose, der α -Hexamylose und der Oktamylose Polymere von 2, 3 oder 4 Molekülen der durch die gleiche Spaltung erhaltenen Diamylose ($C_6H_{10}O_5$)₂ sind¹⁾, und die Diamylose ist ihrerseits nichts anderes als ein Maltoseanhydrid.

Pringsheim (l. c. im folgenden) hatte ursprünglich für die Diamylose eine Formel vorgeschlagen, nach welcher die Wasserabspaltung zwischen den beiden Glukoseresten der Maltose stattgefunden hätte:



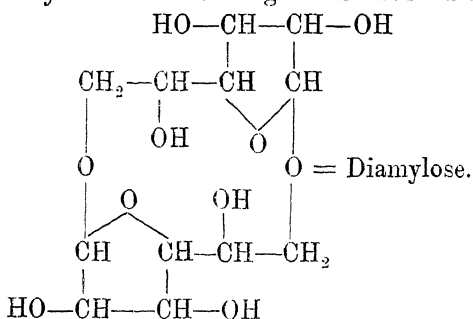
¹⁾ Eine Tetramylose würde daher der Formel $((C_6H_{10}O_5)_2)_2$, eine Hexamylose der Formel $((C_6H_{10}O_5)_2)_3$ und eine Oktamylose der Formel $((C_6H_{10}O_5)_2)_4$ entsprechen.

Karrer und Nägeli¹⁾ haben demgegenüber unter Zugrundelegung der Maltoseformel von Haworth und Leitch²⁾:



festgestellt, daß sich das restierende endständige Hydroxyl der Aldehydhydratgruppe mit einem andern OH des Moleküls anhydriert, und zwar hat Karrer³⁾ den Beweis erbracht, daß es sich dabei um eine Anhydrierung mit der endständigen CH₂OH-Gruppe handelt.

Die Diamylose ist daher folgendermaßen zu formulieren:



Von einer Verbindung dieser Formel dürften drei stereoisomere Reihen derivieren. Eine, bei der, wie dies der angegebenen Strukturformel für die Diamylose entspricht, die zwei benachbarten freien Hydroxylgruppen der beiden Laktone rings außerhalb, eine, bei der sie innerhalb — und eine, bei der sie zur Hälfte nach außen, zur Hälfte innerhalb des großen Molekülrings gelagert sind. Von den drei Stereoisomeren wäre wohl dasjenige das am wenigsten zur Molekülassoziation hinneigende, bei dem beide Laktone rings so gelagert sind, daß die freien Hydroxylgruppen in das Innere des Laktone rings zu liegen kommen und damit der freien Wechselwirkung mit den Hydroxylgruppen anderer Moleküle entzogen sind. Diese Reihe würde den β -Amylosen entsprechen, deren braunrote Färbung mit Jod auf eine geringere Assoziation der Moleküle hindeutet. Von den beiden andern Reihen käme eine den α -Amylosen, die andere der Stärke zu. Die Vertreter beider Reihen sind assoziationsfähig, da sie freie, nach außen gelagerte, benachbarte Hydroxylgruppen besitzen. Sie färben sich daher auf Jodzusatz blau. Bei den Vertretern der β -Amylosereihe würde demgegenüber die Assoziationstendenz der Hydroxylgruppen nur intramolekular, im Innern des großen Rings, zur Auswirkung kommen, eine Auswirkung, die zugleich der Aufspaltung des Ringsystems der Anhydromaltose entgegen-

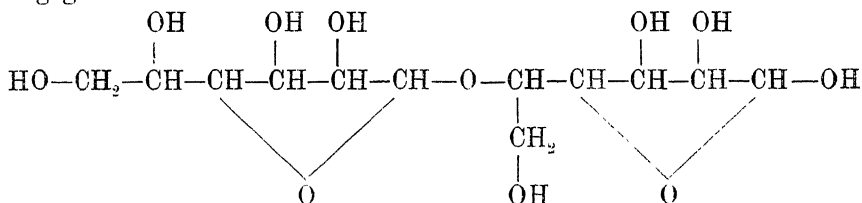
¹⁾ Karrer und Nägeli, *Helvetica chim. acta* 4 (1921) 171, 172.

²⁾ Haworth und Leitch, *Journ. of the chem. Soc. London* 115 (1919) 809.

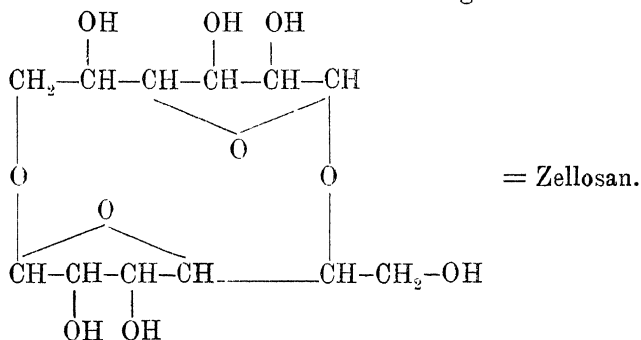
³⁾ Karrer, Mitteilung in der Sitzung der biochemischen Vereinigung in Bern vom 17. Februar 1922 und *Helvetica chim. acta* 1922.

wirken muß. Aus diesem Grunde besitzen wohl die β -Amylosen die geringste Spaltungstendenz.

Das Molekül der Diamylose ist vollständig symmetrisch aufgebaut und es ist daher gleichgültig, auf welcher Seite der Ring durch Hydrolyse aufgesprengt wird. Hier wie dort entsteht als Produkt der Wasseranlagerung Maltose. Anders ist es dagegen beim Zellosan, dem Anhydrid der als Spaltprodukt der Zellulose bekannten Zellobiose. Für diese letztere haben Haworth und Leitch¹⁾ die folgende Formel angegeben:



Die Zellobioseformel unterscheidet sich also von der Maltoseformel der beiden englischen Forscher dadurch, daß der eine Glukose-rest nicht wie bei der Maltose mit der endständigen primären Alkoholgruppe des zweiten Glukoserestes, sondern mit der dieser letzteren benachbarten sekundären Alkoholgruppe glykosidisch veräthert ist. Das Zellobioseanhydrid, das Zellosan, entsteht nun nach Karrer²⁾ in genau derselben Weise wie das Maltoseanhydrid (Diamylose) durch Wasseraustritt aus den beiden endständigen Hydroxylgruppen des Moleküls. Dem Zellosan kommt daher die folgende Formel zu:



In dieser Formel besteht keine Symmetrie. Folglich entstehen verschiedene Produkte, je nachdem die linke oder die rechte Sauerstoffbrücke durch Wasserfixierung aufgespalten wird. Wird die Brücke rechts hydrolysiert, so entsteht durch Öffnung des Sauerstoffrings

¹⁾ Haworth und Leitch, l. c. vorletzte Fußnote.

²⁾ Karrer, l. c. vorletzte Fußnote.

Maltose, wird die Brücke links aufgespalten, so bildet sich Zellobiose. Maltose und Zellobiose sind also durch ihr gemeinsames Anhydrid, das Zellosan, miteinander verbunden und lassen sich wechselseitig ineinander überführen; denn das Zellosan läßt sich durch Wasserabspaltung sowohl aus der Zellobiose, wie aus der Maltose gewinnen und zerfällt umgekehrt hydrolytisch, im Sinne der Formel von Karrer, unter Bildung der beiden Zucker, wie dies die folgende Formulierung wiedergibt:



Da das Zellosan dieselbe Rolle für die Zellulose spielt, wie die Diamylose für die Stärke, so ist es begreiflich, daß infolge der beiden Simultanreaktionen: Bildung von Zellobiose und Bildung von Maltose nur gegen 50 % Zellobiose aus der Zellulose bei der Aufspaltung erhalten werden können.

Über den Polymerisationsgrad des Zellosans in der Zellulose ist noch nichts bekannt, ebenso wie man auch noch im unklaren darüber ist, wie viele Diamylose-ringe sich polymerisieren müssen, um das der Stärke ähnlichste natürliche Kohlenhydrat, das Glykogen, zu geben. Was die Stärke selbst betrifft, so schließt Karrer (l. c.) auf Grund der fast gleichen Verbrennungswärme, daß die Stärkemolekel im Polymerisationsgrad einer Tetramylose oder Hexamylose entspricht. Sie wäre demnach als ein dimeres oder trimeres Maltoseanhydrid aufzufassen. Schon eine Oktamylose, die aus vier Maltoseanhydridmolekülen besteht, käme wegen der viel höheren Verbrennungswärme dieser Verbindung nicht mehr in Betracht. Entsprechend dieser unerwartet einfachen Konstitution ist das Molekulargewicht der desassoziierten Stärke ein sehr niedriges. Nach Karrers Molekulargewichtsbestimmungen bewegt sich dasselbe für die methylierte Stärke verschiedenster Herkunft zwischen 900 und 1200. Berechnete man das Molekulargewicht der Methylostärke, unter Voraussetzung einer totalen Methylierung für Tetra- und Hexamylose und Zugrundelegung der im vorigen angenommenen Konstitutionsformel für die Diamylose (Maltoseanhydrid), so würde man im erstern Fall ein Molekulargewicht von 816, im letztern von 1224 erhalten. Nun haben aber die Versuche von Karrer und Nägeli¹⁾ gezeigt, daß von den 6 freien OH-Gruppen der Diamylose nur 4 Hydroxyle methylierbar sind, von der Tetramylose von 12 freien Hydroxylen dementsprechend nur 8, von der Hexamylose von 18 freien Hydroxylen nur 12. Für die methylierte Tetramylose wäre daher als wirkliches Molekulargewicht nicht 816, sondern 760, für die Hexamylose nicht 1224, sondern 1140 anzunehmen.

Die von Karrer gefundenen durchschnittlichen Molekulargewichte deuten demnach darauf hin, daß in den verschiedenen Stärkearten im allgemeinen wechselnde Gemische von Tetra- und Hexamylose mit Vorwiegen der Hexamylose vorliegen.

Trotz so vieler glänzender Befunde wäre es jedoch verfrüht, das Stärkeproblem als ein endgültig, in allen seinen Teilen gelöstes, zu

¹⁾ Karrer und Nägeli, *Helvetica chim. acta* 4 (1921) 197.

betrachten. Zunächst muß man sich daran erinnern, daß Maquenne¹⁾ in den natürlichen Stärkearten zwei verschiedene Produkte — das mit Jod eine weinrote Färbung gebende, kleisterbildende Amylopektin und die mit Jod sich blaufärbende nicht verkleisternde „Amylose“ — annimmt. Karrer²⁾ hat die Möglichkeit in Erwägung gezogen, daß der Unterschied dieser beiden Stärken, wie der konstitutive Unterschied zwischen Stärke und Glykogen (dessen Grundkörper, wie erwähnt, nach Karrer [l. c.] ebenfalls Maltoseanhydrid ist) in einem verschiedenen Polymerisationsgrad zu suchen sei. Mit Rücksicht auf die Befunde von Samec³⁾, welcher im Amylopektin Phosphorsäure — etwa 0,175 % P_2O_5 — feststellte und durch Einführung von Phosphor in die „Amylosen“-Stoffe mit den Eigenschaften des Amylopektins künstlich herzustellen vermochte, hält es jedoch Karrer für „mindestens ebenso wahrscheinlich“, daß lediglich die phosphorhaltige Beimengung die Eigenschaften der Stärke zu denjenigen des Amylopektins modifiziert. Was den Modus dieser Änderung betrifft, so ließe sich zunächst an eine Bindung denken, da durch die Bindung der Phosphorsäure — gleichviel an welches Polymere — die assoziierenden freien Hydroxylgruppen ausgeschaltet werden könnten. Mit der Herabsetzung des Assoziationsgrades würde aber eine Änderung der Farbenreaktion mit Jod einhergehen.

Gegen eine Bindung spricht jedoch in diesem Fall der sehr geringe Phosphorgehalt des Amylopektins. Dagegen dürfte es sich um eine kolloidchemische Beeinflussung von seiten des dreiwertigen und daher schon in sehr geringen Mengen wirksamen Phosphatanions handeln, die sich in einer Auflockerung der assoziierten Stärke dokumentiert. Die Auflockerung macht sich einerseits in der einem höhern Dispersitätsgrad entsprechenden roten Farbenreaktion mit Jod, andererseits in der zur Verkleisterung führenden Quellbarkeit geltend.

Wie das Phosphatanion können auch die Hydroxylionen der Basen wirken, soweit diese Wirkung nicht, wie z. B. beim Bariumhydroxyd durch den entgegengesetzten positivierenden Effekt der Bariumionen überkompensiert wird.

In Gegenwart freier Hydroxylionen ist daher die Desaggregation meist eine so weitgehende, daß die Lösung auf Jodzusatz gar nicht, oder wie bei der methylierten Stärke Karrers, erst bei großem Ueberschuß mit Braunfärbung reagiert.

¹⁾ Maquenne, *Compt. rend.* **137** (1903) 797, 1266; **138** (1904) 49, 213, 375; **140** (1905) 1303; **142** (1906) 95, 124, 1059; *Bull. de la Soc. chim.* (3) **29** (1903) 1218; (3) **33** (1905) 723; (3) **35**, I—XV (1906); *Ann. de Chim.* (8) **9** (1906) 179.

²⁾ Karrer, *Helvetica chim. acta* **4** (1921) 999.

³⁾ Samec, siehe die Arbeiten von Samec in den kolloidchemischen Beihften **5** (1913) 141; **6** (1914) 231; **8** (1916) 33; **10** (1919) 304; **13** (1921) 165, 272; sowie *Compt. rend.* **172** (1921) 1079.

Wahrscheinlich wird man bei systematischer Durchprüfung der Elektrolytwirkungen gegenüber Stärkespaltgemischen in den Anfangsstadien der Spaltung die durch Wertigkeit, elektrolytische Lösungstension und Wanderungsgeschwindigkeit bestimmte Reihenfolge für die fallende Kraft der Ionen wiederfinden, welche Freundlich beim Arsentrisulfid festgestellt hat.

Der Fällung, der, lange bevor sie makroskopisch sichtbar wird, die entsprechende (allenfalls noch ultramikroskopisch wahrnehmbare) Assoziation zu gröber dispersen Molekülaggregaten vorausgeht, entspricht der Farbumschlag von Braun über Rot zu Blau bei Zusatz von Jod zu einem in kolloidchemischer Reversion befindlichen System.

Die Verhältnisse dürften hier ganz ähnlich liegen, wie bei dem von Wolfgang Ostwald¹⁾ studierten Farbumschlag des Kongorubins von Rot zu Blau beim Uebergang der höher dispersen roten in die gröber disperse blaue Form.

Es geht diese Analogie auch aus dem Verhalten bei der Kapillaranalyse hervor. Wird Filtrierpapier hier wie dort in das polydisperse System eingetaucht, so steigt die hochdisperse rote Form weit in der Filterfaser auf, während die grobdisperse kaum über das Gebiet der Eintauchstelle hinauswandert.

Im Sinne der im vorigen skizzierten Auffassung könnte man die Rolle der Phosphorsäure als eine mehr akzessorische betrachten, die das eigentliche Stärkeproblem, soweit es sich chemisch fassen läßt, nicht berührt. Man hätte sich dann auf die Amylosen zu beschränken. Aber auch hier, im Kernpunkt der Konstitutionsfrage der Stärke selbst, steckt ein noch ungelöstes Problem von fundamentaler Bedeutung.

Schon Pringsheim²⁾ hatte in seinen grundlegenden Arbeiten über die als kristallisierte Dextrine bezeichneten Spaltprodukte der Stärke und des Glykogens³⁾, welche, wie schon Scharfinger⁴⁾ festgestellt, bei der Einwirkung des *Bac. macerans* entstehen, außer der in der Folge von Karrer (l. c.) als ringförmiges Maltoseanhydrid erkannten Diamylose und deren schon erwähnten Polymeren α -Tetra- und α -Hexamylose, eine Triamylose und deren Polymerisationsprodukt, die β -Hexamylose, beschrieben. Von Karrer ist die Existenz einer Triamylose und ihres Polymeren bestritten worden und da es ihm gelang, die Stärke durch den diastatischen Abbau quantitativ in Maltose überzuführen, schienen in der Tat nur Abkömmlinge der Maltose, nicht aber

¹⁾ Wolfgang Ostwald, Kolloidchemische Beihefte 10 (1918/19) 180.

²⁾ Pringsheim u. Langhans, Ber. d. chem. Ges. 45 (1912) 2533; Pringsheim u. Eisner, ebenda 46 (1913) 295; 47 (1914) 2565; Pringsheim, Landwirtsch. Versuchsstat. 84 (1914) 267; Die Naturwissensch. 3 (1915) 95; Pringsheim u. Persch, Ber. d. chem. Ges. 54 (1921) 3162; 55 (1922) 1428; Pringsheim, Hönigfestschrift, herausgegeben von Margosches u. Fuchs (Dresden u. Leipzig 1923) 59.

³⁾ Pringsheim u. Lichtenstein, Ber. d. chem. Ges. 49 (1916) 364.

⁴⁾ Scharfinger, Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. 14 (1905) 722; 19 (1907) 161; 22 (1909) 98; 29 (1911) 188.

ein Trisaccharid und dessen direkte Derivate als Zwischenprodukte der Stärkespaltung annehmbar zu sein.

Vor kurzem stellten nun aber Pictet und Jahn¹⁾ die eigenartige Tatsache fest, daß beim Erhitzen von Kartoffelstärke in Glycerin auf 200—210° ein von diesen Forschern als Trihexosan bezeichneter Körper in einer Ausbeute von etwa 90% entsteht, der der Triamylose von Pringsheim vielleicht entsprechen könnte.

Kommt dem Trihexosan die von Pictet und Jahn angenommene Formel $(C_6H_{10}O_5)_3$ zu, so scheint ein Widerspruch vorhanden zu sein mit der Annahme von Karrer, daß ein ringförmiges Maltoseanhydrid — die Diamylose — als Grundkörper der Stärke anzusprechen sei. Es ist jedoch einleuchtend, daß sich der Befund von Pictet und Jahn mit der Auffassung von Karrer verträgt, falls die Möglichkeit besteht, daß Diamylose und Triamylose Produkte zweier verschiedener Spaltungsrichtungen der Stärke wären. Besitzt die letztere die Konstitution einer Hexamylose²⁾, die der Polymerisation dreier Moleküle Diamylose entstammt, so könnte bei der pyrogenen Zersetzung Trihexosan entstehen, während die diastatische Spaltung zur Maltose führt, unter der Voraussetzung, daß eine solche Hexamylose aus drei symmetrisch übereinandergelagerten Diamyloseringen besteht. Führt man durch ein derartig gebautes Molekül zwei Trennungsflächen parallel zu den Ebenen der Diamyloseringe, so zerfällt es in drei Diamylose-(Maltoseanhydrid)moleküle, bzw. bei gleichzeitiger Hydrolyse in ihr Hydrat, die Maltose. Eine durch die Mittellinie, d. h. durch die Sauerstoffbrücken senkrecht zu den Ebenen der Diamyloseringe gelegte Trennungsfläche, würde dagegen das Hexamylosemolekül in zwei Paare von je drei offenen Lävoglukosanringen zerteilen, die sich unter vermindertem Druck und unter den rigoroseren Bedingungen der Destillation der Stärke im Vakuum als einzelne Lävoglukosanmoleküle schließen, während unter höherem Druck und unter den gelinderen Spaltungsbedingungen, wie sie Pictet und Jahn gewählt haben, eine Vereinigung von je drei Lävoglukosanresten zum Trihexosan zustande käme.

Es könnte aber auch mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß bei der natürlichen Stärkesynthese in den Chloroplasten die Bildungsbedingungen für Triamylose wie für Diamylose gegeben wären. Ver-

¹⁾ Pictet u. Jahn, *Helv. chim. acta* 5 (1922) 640.

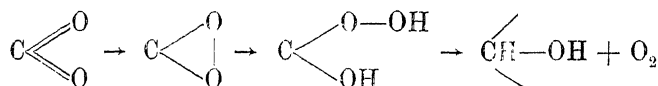
²⁾ Bei einer irreversibeln Umwandlung der Hexamylose ist anzunehmen, daß infolge der Gleichgewichtsstörung durch den Hexamyloseverbrauch dieses Produkt aus vorhandener Tetra- und Diamylose nachgeliefert wird, so daß man praktisch nur mit der Hexamylose zu rechnen hätte.

einigen sich zwei offene Ringsysteme von 6 $\text{CH}-\text{OH}$ -Gruppen unter Tau-

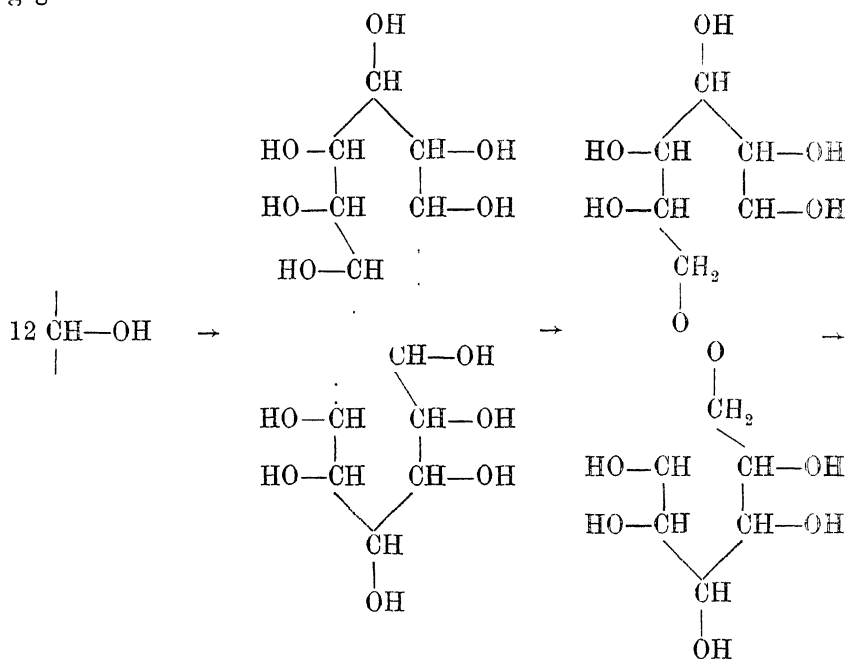
tomeration je einer endständigen $\text{CH}-\text{OH}$ -Gruppe zu $-\text{CH}_2-(\text{O})-$,

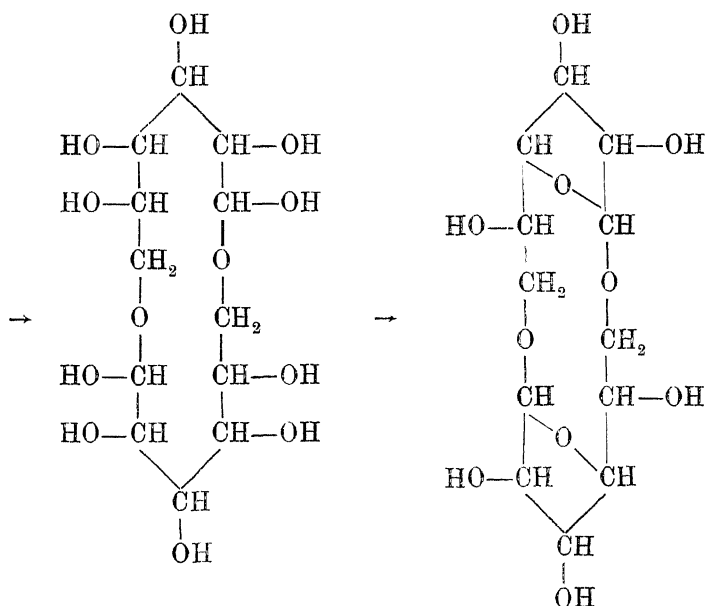
Bindung der freien Valenzen und Abspaltung eines Wassermoleküls in jedem Ring, so resultiert Diamylose ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)₂, vereinigen sich aber in derselben Weise drei derartige offene Ringsysteme mit ihren freien Enden, so kann Triamylose oder Trihexosan (Pictet) als direktes Produkt der Polymerisation und intramolekularen Wasserabspaltung entstehen, wobei einzig jenes „Element der Kohlehydratbildung“ $\text{CH}-\text{OH}$

beteiligt ist, das sich durch einfache Sauerstoffabspaltung aus dem Hydrat eines peroxydischen Kohlensäureisomeren während des Assimilationsprozesses intermediär zu bilden vermag im Sinn der Formeln:

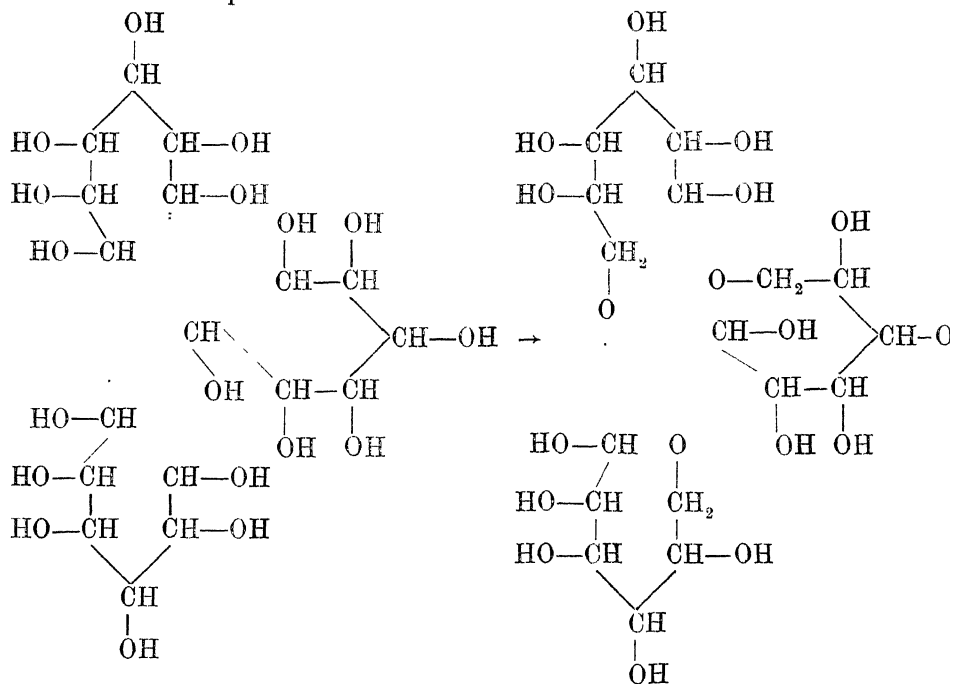


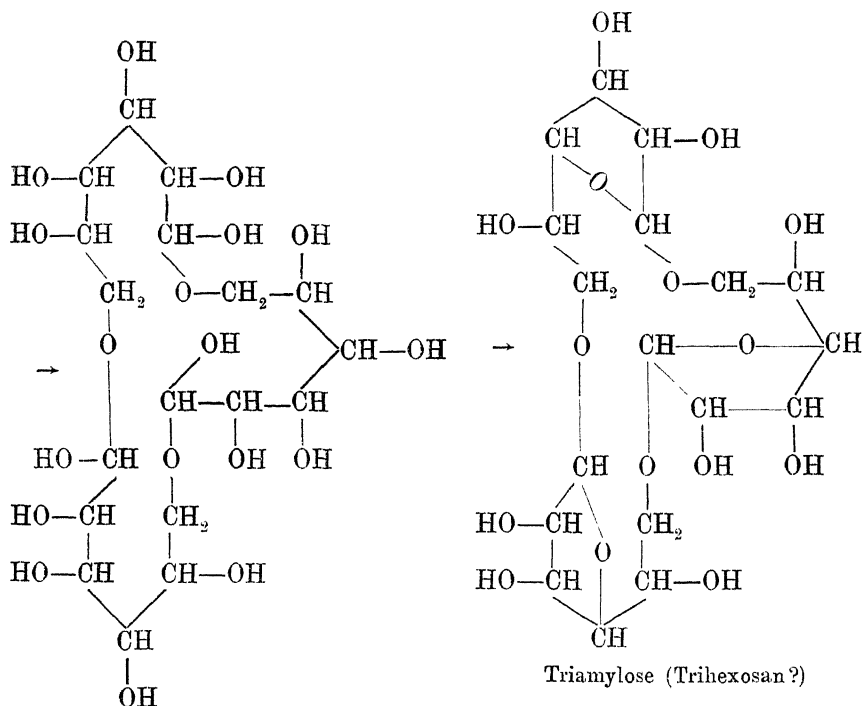
Die Diamylosebildung könnte danach durch folgende Formeln wiedergegeben werden:



Diamylose ($C_{10}H_{16}O_5$)₂ (Maltoseanhydrid).

Der Triamylose könnte in analoger Weise das folgende Bildungsschema entsprechen:



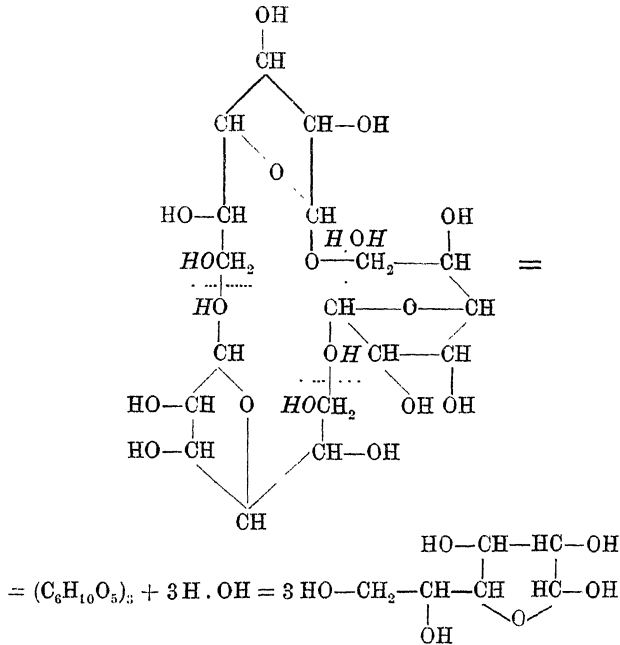


Die im vorigen abgeleitete Verbindung besitzt die Formel einer Triamylose ($C_6H_{10}O_5$)₃. Sie müßte befähigt sein wie das Trihexosan von Pictet u. Jahn ein Nonazetat zu liefern, da in jedem Ring drei freie Hydroxyle stehen. Es müßte ihr gleich dem Trihexosan die Fähigkeit abgehen, siedende Fehlingsche Lösung zu reduzieren, da wie auch bei der Diamylose die hierzu notwendigen reduzierenden Gruppen fehlen. Die Verbindung müßte, wie dies Pictet u. Jahn für ihr Trihexosan beschrieben haben, imstande sein, durch Hydrolyse mittelst verdünnter Schwefelsäure in Glukose überzugehen.

Unter Zugrundelegung der angegebenen Formel wäre zu erwarten, daß die Ueberführung des Trihexosans in Glukose quantitativ ist im Sinne des folgenden Spaltungsschemas (siehe S. 517 oben).

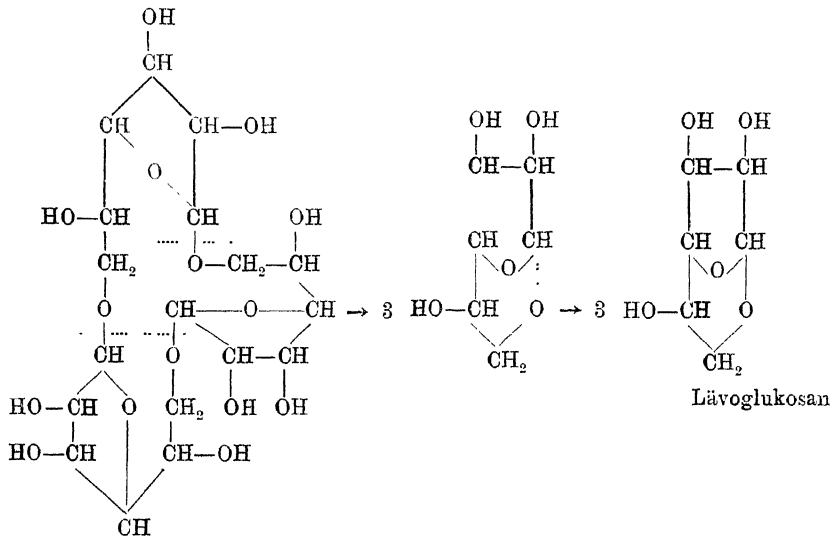
Ein Trihexosan von der hier angenommenen Formel würde auch der Forderung von Pictet u. Jahn gerecht, ein Zwischenprodukt jenes pyrogenen Depolymerisationsvorgangs der Stärke zu sein, dessen Endprodukt das Lävoglukosan darstellt; denn spaltet man das Molekül, so wie es in der folgenden Formel die beiden Striche andeuten in ihre 3 Ringsysteme, so müssen sich die frei werden den Valenzen unter Bildung dreier Moleküle Lävoglukosan wiedervereinigen (siehe S. 517 unten).

Die Betrachtung der natürlichen Stärkesynthese führt also zum Schluß, daß sich hier sehr wohl zwei Ringsysteme bilden könnten, von denen eines der Diamylose, das andere aber einer Triamylose entsprechen würde, deren Eigenschaften auf der ganzen Linie mit den-



Trihexosan + 3 Wasser = 3 Glukose.

jenigen übereinstimmen müßten, die Pictet und Jahn für das als Trihexosan bezeichnete Depolymerisationsprodukt der Stärke $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_3$ beschrieben haben. Von diesen beiden Grundkörpern würde dann ein einfacher Polymerisationsvorgang zur Stärke führen, wie dies für die



Diamylose Karrer angegeben hat und wie dies für die Triamylose aus Analogiegründen vermutet werden könnte. Daß sich unter den Produkten, welche nach der Einwirkung des *Bac. macerans* auf Stärke isoliert wurden, zwei verschiedene Hexamylosen finden, würde also auch im Sinne dieser Auffassung daher rühren können, daß die eine der Hexamylosen der Polymerisation von drei Diamylosemolekülen, die andere dagegen der Polymerisation von zwei Triamylosemolekülen entstammt.

Allein so leicht es ist, die Vorstellung einer gemischten Herkunft der Stärke — aus Diamylose- und Triamylosekernen — mit den bestehenden Bildungsmöglichkeiten in Einklang zu bringen, so schwierig ist es, die von Karrer festgestellte Bildung von 100 % Maltose durch die diastatische Spaltung mit einer solchen Annahme in Einklang zu bringen.

Unter der Voraussetzung, daß das erwähnte pyrogene Zersetzungsprodukt der Stärke in der Tat der Formel $(C_6H_{10}O_5)_3$ entspricht — und der Name Pictets läßt hier kaum einem Zweifel Raum —, neige ich daher mehr der ersteren Annahme zu, daß in der Stärke eine Hexamylose vorliegt, in der drei Diamyloseringe symmetrisch übereinander gelagert sind. Denn daß die pyrogene Zersetzung ihre eigene, von den fermentativen und sonstigen katalytischen Spaltungen durchaus verschiedene Reaktionsbahn besitzt, ist nicht besonders auffallend, wie dies auch die verschiedenen im allgemeinen Teil besprochenen, hierhergehörigen Beispiele illustrieren. Eine Schwierigkeit würde erst dann vorliegen, wenn nicht nur die pyrogene Zersetzung, sondern auch eine fermentative Spaltung primär zu einer Triamylose führen könnte, wie dies der Fall wäre, wenn die von Karrer bestrittene Triamylose von Pringsheim und deren Polymeres, die β -Hexamylose, im Sinne von Pringsheims Annahme, zu den Spaltprodukten, die der *Bacillus macerans* erzeugt, gehören.

Die Triamylose, bzw. deren Polymeres, die β -Hexamylose müßte dann in der Stärke vorgebildet sein und wie sich hieraus quantitativ Maltose bei der diastatischen Spaltung bilden sollte, bliebe ein vollkommenes Rätsel. Bei der Annahme, daß sich primär ein Gemisch von Maltose und Glukose bilden würde¹⁾ und daß dann sekundär der Glukoseanteil durch Reversion ebenfalls in Maltose überginge, müßte man voraussetzen, daß sich die intermediäre Glukosebildung irgendwie verriete²⁾. Auch wäre es bei der relativ großen Stabilität der Glukose

¹⁾ Bei der Spaltung einer Triamylose müßten sich gleich viel Maltose- wie Glukosemoleküle bilden.

²⁾ So müßte es gelingen, in den Anfangsstadien der diastatischen Spaltung, infolge des Vorhandenseins von Glukose, eine Reduktion des Barfoedschen Re-

schwer zu verstehen, daß ihre Reversion zu Maltose quantitativ verlaufen sollte. Jedenfalls wäre, wegen der bisher mangelnden Nachweisbarkeit von intermediär gebildeter Glukose, die weitere Annahme einer sehr schnell verlaufenden Reversion notwendig. Man müßte also wohl die Gegenwart eines reversionsbeschleunigenden Katalysators vermuten. Doch sprechen die tatsächlichen Beobachtungen nur dort für einen solchen, wo eine zur Reversion wie zur Spaltung befähigte Maltase vorhanden ist. Einer nicht mit Maltase vergesellschafteten Diastase würde dagegen die Fähigkeit zur Maltosebildung aus Glukose, ebenso wie zur Maltosespaltung abgehen. Auch in Gegenwart der Maltase wäre aber zu erwarten, daß sich ein Gleichgewicht zwischen Reversion und Spaltung der gebildeten Maltosemoleküle herstellte und daß daher die Bildung von 100% Maltose aus der Stärke schon aus diesem Grunde nicht möglich wäre.

Nun bliebe noch die Möglichkeit, die Spaltung nicht an der Triamylose, sondern direkt an der β -Hexamylose angreifen zu lassen. Während es für die Polymeren, die den Diamylosekern enthalten, ohne weiteres verständlich ist, daß ihre Spaltung zum Maltoseanhydrid und durch dessen Hydrolyse zur Maltose führt, müßte für eine Hexamylose, die den Charakter eines Triamylosepolymeren besitzt, angenommen werden, daß sie aus zwei symmetrisch übereinander angeordneten Triamylosekernen zusammengesetzt wäre, durch welche sich zwei zu den Ringebenen senkrechte Trennungsflächen legen lassen, die das Molekül in drei Gruppen von je zwei offenen Lävoglukosanringen teilen. Je zwei der letzteren müßten sich untereinander zum Maltoseanhydrid, bzw. durch die einsetzende Hydrolyse zu Maltose vereinigen.

Es braucht nicht näher ausgeführt zu werden, warum eine solche Annahme dem Einwand begegnen müßte, daß sich von den intermediär gebildeten, offenen Lävoglukosanringen wenigstens ein Teil zum Lävoglukosan schließen würde. Damit ginge dieser Anteil der Reversion verloren und man erhielte, an Stelle von 100% Maltose, ein Gemisch von Maltose, bzw. Diamylose und Lävoglukosan. Abgesehen davon würde aber auch der Spaltungstyp als solcher für einen fermentativen Prozeß fremdartig anmuten.

Da die Annahme eines in der Stärke vorgebildeten Triamylose-rings, wie aus dem vorigen ersichtlich ist, eine Fülle von Komplika-

agenses zu erhalten, die dem revertierten System, das nur noch Maltose enthält, abgeht. Parallel dem Auftreten eines Reduktionsvermögens gegenüber dem Reagens von Barfoed müßte auch ein starker Abfall der Rechtsdrehung des Systems einhergehen, der im Gefolge der Reversion wieder zum ursprünglichen Wert ansteigt: denn bekanntlich tritt eine merkliche Drehungsänderung an Stärkespaltgemischen erst dann zutage, wenn die Bedingungen für eine Glukosebildung gegeben sind. (Siehe auch im folgenden.)

tionen für das, nach den Befunden von Karrer so einfach scheinende Stärkeproblem mit sich bringen würde, so wäre zu wünschen, daß die jetzt noch der Vorstellung eines Diamylosepolymeren wirklich oder scheinbar entgegenstehenden Befunde eine baldige Aufklärung erfahren.

Mit Sicherheit kann dagegen in einem anderen Kohlenhydrat, dem Inulin, nach den Untersuchungen von Pringsheim¹⁾, das Polymere eines Trisaccharids, der Anhydrotrifruktose, angenommen werden. Da die Molekulargewichtsbestimmungen²⁾ die Gegenwart von neun Fruktoseresten ergeben haben, so würde es sich also um das dreifache Polymere der Anhydrotrifruktose handeln. Daß nicht etwa eine Formel ins Auge zu fassen ist, bei der neun einfache Anhydrofruktosemoleküle durch Nebenvalezen verknüpft sind, eine Ansicht, die Karrer, Staub und Wälti³⁾ vertreten haben, hat Pringsheim⁴⁾ durch Azetylieren des Inulins und Verseifen des Azetats mit Natriumalkoholat erwiesen, denn es entsteht dabei ein Körper von der Zusammensetzung $(C_6H_{10}O_5)_3NaOH$, der Fehlingsche Lösung ungefähr dreimal schwächer reduziert als Fruktose. Die drei Fruktosereste, die demnach durch Hauptvalenzen miteinander verbunden sind, dürften ganz analog, wie dies für die Diamylose und die in Diskussion stehende Triamylose im vorigen dargelegt worden ist, zu einem ringförmigen Anhydrid vereinigt sein. Pringsheim⁵⁾ hat, gestützt auf die leichte Hydrolysierbarkeit des Inulins, die sehr plausible Annahme vertreten, daß sich die Anhydrotrifruktose nicht von der in Lösung beständigen Fruktose, die den Oxyhydrofuranring enthält, ableite, sondern wie der Rohrzucker, von der labileren γ -Fruktose, der ein unbeständiger Sauerstoffring zukommt⁶⁾. Der Hydrolyse des Inulins, bzw. des in ihr enthaltenen ringförmigen Grundkörpers, eben der Anhydrotrifruktose, würde die Umlagerung der labilen γ -Fruktose in die stabile, kristallisierbare Modifikation folgen⁷⁾. Die Spaltung [des Inulins würde,

¹⁾ Pringsheim und Aronowsky, Ber. d. chem. Ges. 54 (1921) 1281: Pringsheim und Laßmann, ebenda 55 (1922) 1409: Pringsheim und Dernikos, ebenda, 55 (1922) 1433.

²⁾ Karrer und Lina Lang, Helv. chim. acta 4 (1921) 249: Pringsheim, loc. cit. vorige Fußnote.

³⁾ Karrer, Staub und Wälti, Helv. chim. acta 5 (1922) 129.

⁴⁾ Pringsheim, siehe die von Margosches und Fuchs herausgegebene **Hönig-Festschrift** (Dresden und Leipzig 1923) S. 64 des dem Inulin gewidmeten Beitrags von Pringsheim.

⁵⁾ Pringsheim, loc. cit. vorige Fußnote.

⁶⁾ Irvine und Steele, Journ. chem. Soc. 117,118 (1920) 1474.

⁷⁾ Haworth und Law, ebenda, 109 (1917) 1314.

nach dem Vorausgeschickten, in folgenden Phasen verlaufen: 1. Depolymerisation des Inulins in drei Anhydrotrifruktosidmoleküle. 2. Hydrolytische Aufspaltung des Anhydrotrifruktosidrings zu γ -Fructose und nachfolgende Umlagerung in die gewöhnliche Fructose.

Für das inulinspaltende Prinzip, die Inulinase, muß also, gerade so gut wie für die stärke- und glykogenspaltende Diastase, die Zweienzymtheorie Gültigkeit besitzen, und es ist anzunehmen, daß sich wie beim *Bazillus macerans* Fermente werden auffinden lassen, die nur der depolymerisierenden Funktion zu genügen vermögen, während andere Enzyme erst dort angreifen, wo ein depolymerisierendes Agens versagt, bei der Hydrolyse des Anhydrotrifruktosidrings. Im ersteren Fall würde die Spaltung nicht über die von Tanret¹⁾ in inulinbildenden Pflanzen²⁾ aufgefundenen, als Inulindextrine³⁾ bezeichneten Inulindepolymerisate⁴⁾ hinausgehen, deren einfachster Repräsentant eben die Anhydrotrifruktose ist, während im anderen Fall erst die vorausgegangene Depolymerisation die Bedingungen für die hydrolysierende Phase schafft⁵⁾.

Mit Rücksicht auf die große Analogie, die der Abbau der verschiedenen höheren Kohlenhydrate in den wesentlichen Punkten aufweist, seien die einzelnen, teils physikalischen, teils chemischen Spaltungsphasen an der Hand des theoretisch und praktisch wichtigsten Beispiels, der Stärkespaltung, im folgenden kurz zusammengefaßt:

1. Ueberführung der unlöslichen Stärkesphärokristalle in eine Pseudolösung, wie sie in jeder kolloiden, durch Erhitzen mit Wasser aus Stärke gewonnenen Lösung vorliegt.

2. Desaggregation der in den kolloiden Stärketeilchen vorliegenden assoziierten Stärke: Stärkemolekel^x.

Diese Phase ist durch eine der Zunahme des Dispersitätsgrades parallelgehende Verschiebung des Farbenbildes der Jodreaktion von

¹⁾ Tanret, Bl. (3) 9 (1923) 200, 227, 625.

²⁾ Dahlie, Topinambor, Zichorie etc.

³⁾ Ueber Inulindextrine nicht fermentativen Ursprungs, die — gleich denjenigen, welche unter dem Einfluß von Inulinasen aus dem Inulin hervorgehen — nicht reduzierend sind, also noch den intakten Anhydrotrifruktosidring enthalten, siehe Hönig und Schubert, Monatshefte f. Chemie 8 (1887) 529, welche Forscher auf pyrogenem Wege, sowohl durch Erhitzen für sich allein wie in Glycerin, zu solchen Zwischenprodukten des Inulinabbaus gelangten.

⁴⁾ Siehe auch Wolff und Geslin, Compt. rend. 165 (1917) 651; Ann. de l'Inst. Pasteur 32 (1918) 71.

⁵⁾ Ueber die Kinetik der als monomolekulare Reaktion angesprochenen Inulinspaltung s. Boselli, Ann. de l'Inst. Pasteur 25 (1911) 695.

blau über violett, rot, braun zum Gelb der reinen Jodlösung charakterisiert.

3. Depolymerisation der einer Tetra- oder Hexamylose entsprechenden Stärkemolekel zur Diamylose, dem ringförmigen Maltoseanhydrid. (Siehe Formel S. 508 und 515.)

4. Hydrolytische Oeffnung des Ringsystems der Diamylose an einer der beiden Sauerstoffbrücken. Diese Phase wird durch die Bildung reduzierender Maltose aus nicht reduzierender Amylose gekennzeichnet.

5. Hydrolytische Aufspaltung der Glykosidbindung zwischen den beiden Glukoseresten der Maltose. Diese Phase wird von einer starken polarimetrischen Aenderung begleitet, entsprechend dem Unterschied im optischen Drehungsvermögen von Maltose und Glukose.

Entsprechend diesen verschiedenen Phasen des Stärkeabbaus muß man die spaltenden Agentien in solche einteilen, die eine Ueberführung der Stärke in ihr letztes Spaltprodukt, den Traubenzucker, bewerkstelligen und in solche, die nur eine partielle Aufspaltung bedingen. Unter den letztern ist dann wiederum eine Differenzierung nach dem Spaltungsgrad geboten.

Die ganze Stufenfolge des Stärkeabbaus vermögen starke Mineralsäuren, wie Salzsäure und Schwefelsäure, in Verbindung mit erhöhter Temperatur, durchzuführen. Doch selbst diese spalten nicht ganz vollständig, weil mit der Konzentrationszunahme des Traubenzuckers in der stark sauren Lösung eine Gegenreaktion unter Bildung von schwer angreifbaren, dem Praktiker¹⁾ schon lange bekannten Reversionsdextrinen, einsetzt, wie sie Grimaux und Lefèvre²⁾ sowie Wohl³⁾

¹⁾ Siehe das Handbuch von König.

²⁾ Grimaux u. Lefèvre, Compt. rend. 103, 146.

³⁾ Unter den Arbeiten von Wohl, Ber. d. deutschen chem. Ges. 23 (1890) 2084 und im folgenden befindet sich eine (Wohl u. Glimm, Biochem. Zeitschrift 37 (1910) 549), in der das Resultat in bezug auf Amylasereversionsdextrine negativ ist. Ich betone dies ausdrücklich, weil aus diesem Literaturzitat, das ich der Vollständigkeit wegen anführen mußte, meine Gegner in der Formaldehyd-Stärkepolemik, wo die Bildung von Säurereversionsdextrinen in Diskussion stand, herauskonstruiert haben, daß ich das Gegenteil von dem behaupte, was in der betreffenden Arbeit steht! Die Arbeiten von Emil Fischer, Croft-Hill, Emmerling, Armstrong, Bourquelot u. Hérissé, Compt. rend. 136, 1143, 1404, Grimaux u. Lefèvre, die sich mit den Produkten der Reversion im Gebiet der Polysaccharide befassen, waren mir damals schon Rechtfertigung genug, und heute, da Arbeiten wie diejenigen der Herren Prof. Pictet u. Karrer selbst in die Konstitution mancher der in Frage kommenden Reversionsprodukte hineingeleuchtet haben (siehe Helv. chim. acta), sollte es da noch notwendig sein, die Existenz von Reversionsdextrinen zu beweisen? —

charakterisiert haben. Es sind dies Stoffe, die den von A. und J. Pictet in den *Helvetica chimica acta* beschriebenen, durch Polymerisation von Glukose, Lävoglukosan und Glukosan mittelst wasserfreiem Zinkchlorid erhaltenen synthetischen Isomeren (Diglukosan und Tetraglukosan) der erwähnten Diamylose und Tetramylose von Pringsheim und Karrer nahe verwandt sein dürften. Auch die Bildung der Stärkemolekel aus dem Diamylosering beruht, wie wir sahen, auf einer Polymerisation, und ein einfaches Erhitzen der Lösungen genügt, um die verschiedenen Polymerisationsprodukte der Diamylose wechselseitig bis zu einem bestimmten Gleichgewicht ineinander überzuführen. Auch hier dürfte sich mit der einfachen Polymerisation und Depolymerisation, die Umlagerung der leicht spaltbaren α -Form in die durch Pankreasdiastase nicht angreifbare β -Form der Amylosen komplizieren.

An die chemischen Vorgänge der Polymerisation bzw. Depolymerisation schließt sich unmittelbar die gleichsam physikalische Polymerisation bzw. Depolymerisation- resp. Assoziation und Desaggregation von Molekülkomplexen an; denn auch in dieser Phase des beginnenden Stärkeabbaus konnte Karrer die z. B. durch Methylierung desaggregierten Molekularkomplexe durch Erhitzen in polymerisationsbegünstigenden Lösungsmitteln wiederum in gröber disperse kolloide Teilchen überführen.

Hand in Hand mit der Veränderung des Dispersitätsgrades nehmen daher Stärkelösungen, die schon die Fähigkeit zur Bläuung mit Jod verloren hatten, wiederum die der nativen Stärke eigentümliche Blaufärbung mit Jod an und parallel damit tritt in vorher optisch leeren Lösungen desassoziierter Stärke das Tyndallphänomen auf. Auch macht sich die kolloidchemische Reversion durch ultramikroskopisch, oft auch mikroskopisch und selbst makroskopisch feststellbare Trübungen geltend.

Endlich vermögen die kolloiden, Molekülaggregate enthaltenden Lösungen (die assoziierte Stärke), welche bei der Behandlung mit Wasser aus den Stärkesphärokristallen hervorgehen, wiederum Sphärite abzuscheiden¹⁾, sei es unter dem beschleunigenden Einfluß eines revertierenden diastatischen Enzyms, wie es von Fernbach und Wolff²⁾ angenommen und mit dem Namen Amylokoagulase bezeichnet worden ist, sei es nach Maggi (l. c.) unter dem Einfluß von Säuren.

Bei den erwähnten, durch alte und neue Forschungsergebnisse sichergestellten Reversionsprozessen handelt es sich für alle Phasen

¹⁾ Maquenne, Bull. Soc. chim. [3] 35 (1906) 1, 256.

²⁾ Wolff u. Fernbach, Compt. rend. 137 (1903) 718; 138. (1904) 819.

der Stärkespaltung um theoretisch und praktisch so wichtige Vorgänge, daß deren Kenntnis notwendig ist für die Beurteilung der Resultate, die bei der Einwirkung spaltender Agentien auf die Stärke erhalten werden können. Je schwächer das spaltende Agens ist, desto ausgeprägter sind die komplizierenden Hemmungserscheinungen, die mit der Reversibilität wie Ursache und Wirkung zusammenhängen.

Daher läßt auch das Bild, welches die Einwirkung von Formaldehyd auf Stärke bietet, nicht nur die Merkmale der Spaltung, sondern auch diejenigen der Resynthese erkennen und zwar in allen Phasen, mit Ausnahme der letzten, der Maltosespaltung zu Glukose. Das Fehlen dieser letzten Spaltungsphase kann aus der nur sehr geringfügigen polarimetrischen Änderung bei der Einwirkung von Formaldehyd auf Stärke¹⁾ wie auch auf Glykogen geschlossen werden.

Denn wie schon Samec²⁾ festgestellt hat, kommt die Drehungsänderung erst einem weit vorgeschrittenen Stadium der Stärkespaltung zu, und nach den Untersuchungen von Karrer läßt sich heute ganz genau der Moment präzisieren, in dem die Drehungsänderung einsetzt.

Nach den Werten von Karrer kommt der der Stärke Punkt für Punkt entsprechenden α -Tetramylose der Drehungswinkel $+138^\circ$, der Diamylose der Drehungswinkel $+136,6^\circ$ und der Maltose der Drehungswinkel $+137,5^\circ$ zu. Spaltet also ein Agens die Stärke nur bis zur Diamylose auf, d. h. beschränkt sich der Einfluß lediglich auf die depolymerisierende Phase, wie dies für die Diastase des *Bacillus macerans* der Fall ist, so werden sogar noch etwas größere Drehungsabnahmen beobachtet, als wenn ein gewöhnliches diastatisches Prinzip zur Wirkung kommt. Wie es der von den französischen Forschern hauptsächlich vertretenen Zweienzymtheorie, der Diastase entspricht, wirkt also die letztere depolymerisierend und hydrolysierend zugleich. Sie führt die Spaltung unter Oeffnung des Diamyloserings bis zur Maltose durch. Dabei nimmt aber der Drehungswinkel nicht ab, sondern nach den Werten von Karrer von $+136,6^\circ$ auf $+137,5^\circ$ wieder zu. Die Gesamtabnahme des Drehungswinkels von der Stärke zur Maltose entspricht also nur $0,5^\circ$. Sie ist demnach von derselben Größenordnung, wie sie von H. Maggi (l. c.) bei der Einwirkung von Formaldehyd auf Stärke gefunden worden ist. Daß die Drehungsabnahme bei den Kontrollversuchen mit Speichel größer ist, rührt einfach von dem Maltasegehalt des Speichels her, denn mit der Hydrolyse der Maltose zu Glukose setzt auch der Drehungsabfall ein.

¹⁾ H. Maggi. Fermentforschung 2 (1919) 365, 366.

²⁾ Samec, Kolloidchemische Beihefte 5 (1913) 171; (1915) 150.

Ein Hauptargument gegen meine Annahme einer abbauenden Wirkung des Formaldehyds gegenüber der Stärke, die mangelnde Drehungsabnahme, ist also ohne weiteres durch die neuesten Forschungen über die Stärke erledigt. Des weiteren wurde die Bildung von reduzierendem Zucker aus der Stärke unter dem Einfluß des Formaldehyds bestritten. Selbst wenn dies richtig wäre, würde damit doch nichts anderes bewiesen sein, als daß der Formaldehyd, wie die Diastase des *Bacillus macerans*, lediglich depolymerisierend zu wirken vermöchte, daß ihm aber die Fähigkeit abgehen würde, den Diamylosering zu öffnen.

Tatsächlich kann man sich aber ohne Schwierigkeit von der Phase der Verzuckerung überzeugen.

So kann man zur Ausführung der Fehlingschen Probe $\frac{1}{4}$ g des Formaldehydpolymeren¹⁾ mit $\frac{1}{4}$ g Weizenstärke in Substanz + 10 ccm Wasser vermischen und gleichzeitig je eine Kontrolle von $\frac{1}{2}$ g polymerem Formaldehyd mit 10 ccm Wasser und eine von $\frac{1}{2}$ g Weizenstärke mit 10 ccm Wasser ansetzen. Alle drei Reagenzgläser erhalten hierauf einen Zusatz von 5 ccm einer frisch hergestellten Mischung gleicher Volumina von Fehlingscher Lösung I und Fehlingscher Lösung II. Dann setzt man alle Gläser gleichzeitig in ein siedendes Wasserbad und beläßt sie darin z. B. $\frac{1}{4}$ Stunde. Nach dieser Zeit ist in dem Gemisch die Blaufärbung der Lösung vollständig, oder nahezu vollständig verschwunden. Der Bodenkörper ist stark gelb bis rot verfärbt und in der Grenzzone zwischen Flüssigkeit und Bodenkörper hat sich ein reichliches rotes Kupferoxyduldepot, ja oft sogar ein Kupferspiegel, abgeschieden.

Demgegenüber ist bei der Stärkekontrolle die Flüssigkeit noch stark blau gefärbt und zeigt bei der Probe mit Stärke in Substanz über unveränderter Stärke, an Stelle des ziegelmehlfarbenen Niederschlags von Kupferoxydul, einen tiefblauen Niederschlag. Die Reduktionswirkung, die sich in einer schwachen Gelbfärbung äußert, ist nur sehr gering. Sie dürfte daher rühren, daß das alkalische Kupferoxydul nicht ganz indifferent ist gegenüber der Stärke, ein Umstand, der gewiß nicht zu verwundern ist, wenn man an die Verwandtschaft der Fehlingschen Lösung mit dem Schweizerschen Reagens denkt, welch letzteres selbst die viel resistenteren Zellulose in Lösung überzuführen vermag.

Die Formaldehydkontrolle, die einerseits wegen der Eigenreduktionsfähigkeit des Formaldehyds, andererseits hier, wie bei der Moore-Hellerschen Probe, wegen der Möglichkeit einer Formosebildung in der alkalischen Lösung in jedem Fall angesetzt werden muß, läßt ebenfalls nur eine so unvollkommene Reduktion des Fehlingschen Reagens erkennen, daß es völlig ausgeschlossen erscheint, den Ausfall des Mischversuches als eine Summationswirkung der Reduktion durch die beiden Komponenten zu erklären.

Auch bei einer Versuchsanordnung nach der Fehling-Soxhletschen Methode kann (bei Verwendung desselben polymeren Formaldehyds) und fester

¹⁾ Hergestellt durch Eindunsten von Formalin bei mäßiger Temperatur auf der Dampfheizung).

Weizenstärke¹⁾ im Gemisch eine starke Reduktionswirkung, die sich in der Abfärbung eines schönen Kupferspiegels neben Kupferoxydul äußert, nachgewiesen werden, während beim gewöhnlichen Formalin eine stärkere Reduktionswirkung des Gemisches gegenüber den Komponenten nicht deutlich festgestellt werden kann.

Bei dieser Versuchsanordnung verfährt man in der Weise, daß drei Erlenmeyerkölbchen mit je 5 ccm der Fehlingschen Lösung I + 5 ccm der Fehlingschen Lösung II + 40 ccm Wasser beschickt und auf dem Asbestdrahtnetz zum Kochen erhitzt werden. Hierauf nimmt man die Flammen fort und spült in jedes der Kölbchen 1 g des polymeren festen Formaldehyds, in ein zweites 1 g Weizenstärke und in das dritte Kölbchen ein Gemisch von $\frac{1}{2}$ g polymerem Formaldehyd + $\frac{1}{2}$ g Weizenstärke mit je 20 ccm Wasser. Dann werden alle drei Kölbchen gleichzeitig im siedenden Wasserbad ca. $\frac{1}{4}$ Stunde lang erhitzt. Nach dieser Zeit zeigt der Mischversuch vollständige oder nahezu vollständige Reduktion. Die Flüssigkeit ist entfärbt, Boden und Seitenwände des Kölbchens sind mit einem schönen Kupferspiegel²⁾ überzogen und das Depot enthält rotes Kupferoxydul. Demgegenüber zeigt der Versuch mit Weizenstärke allein eine höchstens spurenweise Reduktionswirkung und der polymere Formaldehyd allein zeigt — trotzdem er in doppelt so großen Mengen vorhanden ist wie beim Mischversuch — eine unvergleichlich viel geringere Reduktionswirkung als dieser. So ist die Flüssigkeit noch ausgesprochen blau gefärbt.

Endlich erweist sich bei der Feststellung der Reduktionswirkung nach der Methode von Bang die frisch hergestellte Mischung des Formaldehyd-polymeren mit Weizenstärke bedeutend stärker reduzierend als die Komponenten.

Es muß nun allerdings hinzugefügt werden, daß ein prägnantes Reduktionsbild der Mischversuche nur beim Arbeiten mit polymerisiertem Formaldehyd erhalten wird. Beim Arbeiten mit gewöhnlichem Formalin ist zwar die stärkere Reduktionswirkung bei den Mischversuchen unverkennbar, wenn man mit Lösungen der leichter angreifbaren und relativ gut verzuckerbaren Stärkesorten, wie Weizenstärke, arbeitet und die Formalin-Stärkegemische nicht länger in Berührung läßt, als dies ein nach dem gewöhnlichen Lintnerschen Verfahren³⁾ ausgeführter Reduktionsversuch erfordert.

Beim Arbeiten mit der überaus schwer angreifbaren Kartoffelstärke, die selbst in der als „lösliche Stärke“ von Kahlbaum und anderen Firmen in den Handel gebrachten vorpräparierten Form für solche Versuche wenig geeignet ist, erhält man dagegen, namentlich an gestandenen Reaktionsgemischen, keine deutlich stärkeren Reduktionswirkungen gegenüber den Komponenten allein, ein Umstand, der von gegnerischer Seite immer wieder herausgegriffen wurde, um das

¹⁾ Die Weizenstärke wurde nur in Form von „Weizenstärkepuder Ia“ (geliefert von der Firma Brändli und Gräub in Bern) verwendet.

²⁾ Die Methode ließe sich vielleicht technisch zur Verkupferung verwenden.

³⁾ Lintner, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 31 (1908) II, 421.

Bestehen einer abbauenden Wirkung des Formaldehyds gegenüber der Stärke überhaupt in Abrede zu stellen.

Aus welchem Grund wirkt nun der polymere Formaldehyd so viel stärker als die gewöhnlichen Formalinlösungen?

Es kann sich nicht darum handeln, daß bei dieser Versuchsanordnung höhere Konzentrationen zur Wirkung kommen. Denn in 10 ccm eines hälftigen Gemisches von Formalin- und Stärkelösung, wie wir es oft verwendeten, sind gegen 2 g Formaldehyd enthalten, während bei dem vorhin angegebenen Mischversuch mit polymerem Formaldehyd und Stärke nur $\frac{1}{4}$ g auf 10 ccm Wasser kommen.

Die Verminderung der Ameisensäure in dem eingedunsteten Präparat, gegenüber dem gewöhnlichen Formalin, könnte schon eher in Frage kommen. Denn, wie schon im Abschnitt „Theorie der Diastasewirkung“ erwähnt wurde, wirken die Wasserstoffionen der Ameisensäure in höheren Konzentrationen beim Formalin gerade so wie bei der analogen Diastasewirkung hemmend¹⁾. Im Falle einer Säurehydrolyse müßte dagegen die Formalinwirkung mit dem Ameisensäuregehalt zunehmen²⁾. Auch ergaben Kontrollversuche mit Ameisensäure allein in den für das Formalin in Frage kommenden Konzentrationen keinerlei Anzeichen eines Abbaus³⁾. Die Säurehemmung äußert sich in der Begünstigung der Reversionsprozesse in verschiedenen Phasen der Stärkespaltung.

So setzen Wasserstoffionen im Gegensatz zu Hydroxylionen die Quellungs-fähigkeit der Stärke herab, welche letztere Eigenschaft eine wesentliche Rolle bei der Spaltung der Substrate spielen dürfte⁴⁾ und die gerade beim Formaldehyd, infolge seines enormen Hydratationsvermögens⁵⁾, sehr stark in Betracht fällt⁶⁾.

Ferner beschleunigen die Wasserstoffionen die Rückbildung von Stärkesphäriten aus Stärkelösungen, eine Wirkung, die, wie erwähnt, ihr fermentatives Analogon in den unter anderem von Fernbach u. Wolff loc. cit. angegebenen Amylokoagulasewirkungen besitzt.

Die Wasserstoffionen wirken vermindern auf den Dispersitätsgrad von Stärkespaltgemischen, die sich noch ganz oder teilweise in der Phase der molekularen Desaggregation befinden. Dementsprechend begünstigen sie die Rück-

¹⁾ G. Woker, Ber. d. chem. Ges. 49 (1916) 2315; Woker u. Maggi, Ebenda, 52 (1919) 1603.

²⁾ G. Woker, loc. cit. vorige Fußnote; H. Maggi, Fermentforschung 2, (1919) 334, 369, 377—381, 406 ff., 425; 436—439.

³⁾ G. Woker, loc. cit. vorige Fußnoten; Maggi u. Woker, Ber. d. chem. Ges. 51 (1918) 792, 793.

⁴⁾ Ueber den Zusammenhang zwischen Quellung und Spaltung s. Wolfgang Ostwald, Archiv f. d. ges. Physiol. 111 (1906) 581 und folgende Fußnoten. Robertson, Journ. of Biol. Chem. 2 (1907) 317; Physikal. Chemie der Proteine (Dresden 1912) 379; Ringer, Z. S. f. Koll. 19 (1916) 253.

⁵⁾ Ueber die Verknüpfung von Quellungs-förderung und Hydratisierung s. Wo. Ostwald, Z. S. f. Koll. 24 (1918) 7; Biochem. Zeitschr. 100 (1919) 287, 288.

⁶⁾ Ueber die durch die Hydratationswirkung des Formaldehyds bedingte Hemmung des Altbackenwerdens des Brotes s. Katz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 96 (1915/16) 314.

bildung von mit Jod sich blaufärbenden Stärkemolaten aus der höherdispersen, d. h. weitgehender in Bruchstücke von Molekülaggregaten aufgelösten, mit Jod rot oder braun reagierenden Form.

Die Wasserstoffionen irgendwelcher Herkunft stellen jedoch in dieser Hinsicht keinen Einzelfall dar. Dank ihrer hohen Wanderungsgeschwindigkeit reihen sie sich in ihrer kolloidchemischen Wirkung den Salzen mit mehrwertigen Kationen an, bei denen die Kationenwirkung nicht durch einen entgegengesetzten starken Effekt des Anions überkompensiert wird. So begünstigt z. B. Chlorbarium, ebenso wie die Salzsäure, die Rückbläuung polydisperser Stärkespaltgemische, während die auch sonst gegenüber Biokolloiden häufig im auflösenden Sinne wirkenden Alkalibromide den entgegengesetzten Einfluß erkennen lassen. Dementsprechend erhielt ich auf Zusatz von je 10 ccm der molaren Lösungen von Bromnatrium, Bariumchlorid und Salzsäure zu Stärkespaltgemischen, die nur noch rot bis violettrot mit Jod reagierten, eine Rückbläuung bei den letztgenannten Elektrolytzusätzen.

Trotzdem nach diesen Beobachtungen die Säurehemmung, wie die analogen Einflüsse von Salzen, bzw. deren Kationen, eine große Rolle spielen, ist es unwahrscheinlich, daß sie allein die effektive Differenz zwischen dem polymerisierten Formaldehyd und dem gewöhnlichen Formalin verursachen. Denn von gegnerischer Seite wurde auch mit frisch destilliertem Formalin ein negatives Resultat in bezug auf die Verzuckerung erhalten, während die der physikalischen Spaltung, d. h. der Aufteilung der kolloiden Molekülaggregate, entsprechende Aenderung des Dispersitätsgrades, welche die Jodreaktion zu erkennen gibt, auch hier vorhanden ist. Da im frisch destillierten, bzw. gasförmigen Formaldehyd nur einfache $\text{H}-\text{CH}=\text{O}$ -Moleküle vorhanden sein dürften, so war ein solches Resultat nach der alten Auffassung über Stärkekonstitution und Stärkeabbau schwer zu verstehen, konnte doch, wie für die echte Diastase, für den Formaldehyd nur eine Art der Wirkung in Frage kommen, die hydrolysierende. Diese Auffassung verknüpfte eine spaltende Wirkung des Formaldehyds gerade mit seinen isolierten Molekülen, so wie dies in der Einleitung und im Abschnitt „Theorie der Diastasewirkung“ dargelegt wurde. Eine Untersuchung der polymeren Formaldehyde mußte bei der nach der alten Theorie ausschließlich in Frage kommenden Hydrolyse zwecklos erscheinen.

Sofort änderte sich aber die Sache, als durch die neuesten Untersuchungen im Gebiet der Chemie der höheren Kohlenhydrate der chemische Teil der diastatischen Stärkespaltung in zwei prinzipiell verschiedene Phasen: in eine erste, depolymerisierende und in eine zweite, den Diamylosering zu Maltose öffnende, hydrolysierende Phase zerlegt wurde. Damit rückten die polymeren Formaldehyde wie selbstver-

ständig in den Vordergrund, und daß der Polymerisationszustand des Formaldehyds ein sehr wesentliches Moment für seine Spaltungsfähigkeit darstellt, beweisen eben die starken Differenzen im Ausfall der Fehlingschen Probe beim Formaldehyd und seinen Polymeren. Auch im gewöhnlichen Formalin ist ein geringerer oder größerer Teil der Moleküle in polymerisierter Form vorhanden, und diesem Umstand könnte das Spaltungsvermögen, das an die Realisierung der Depolymerisationsphase geknüpft ist, zuzuschreiben sein.

Die ganz verschiedenen, mit der Reaktion variierenden Qualitäten des Formaldehyds in dieser Hinsicht dürften auch die diametral entgegengesetzte Beurteilung der spaltenden Fähigkeiten des Formaldehyds verschuldet haben.

Es fragt sich nun, wie ist der Einfluß des Polymerisationszustandes des Formaldehyds auf die Depolymerisation der Polyamylose Stärke zu erklären?

Ist es die Depolymerisation oder gerade umgekehrt die Polymerisation des Formaldehyds, welche die Depolymerisation der Stärke bedingt? Da der polymerisierte Formaldehyd der stärker wirksame ist, so erscheint die erstere Annahme wahrscheinlicher, wonach der polymere Formaldehyd, indem er sich depolymerisiert, zugleich den analogen Vorgang in den Stärkemolekülen nach sich zieht.

Das ist nun eine Auffassung, die, auf die Fermente übertragen, zu der vielumstrittenen Theorie zurückführt, die der geniale Liebig¹⁾ über die Fermente und ihre Wirkungen, als Spezialfall der im allgemeinen Teil besprochenen induzierten Reaktionen, entwickelt hat. Nach Liebig wären die spaltenden Fermente in Zersetzung begriffene Stoffe, und ihre eigene Veränderung sollte sich dem Substrat mitteilen, das sich mit einem Ferment in Berührung befindet.

Auf den Fall der Stärke übertragen, würde dies bedeuten, daß die Diastasen die Depolymerisation der Tetra- und Hexaamylosen bedingen, weil sie sich selbst depolymerisieren. Als Modell für diese Phase der diastatischen Wirksamkeit würden im Zustand der Depolymerisation sich befindende polymere Formaldehyde dienen. An diese Phase — zum Teil auch schon nebenher verlaufend — würde sich dann beim Formaldehyd, wie bei den Fermenten, die hydrolysierende Phase anschließen, deren Voraussetzung die früher skizzierte intermediäre Hydratbildung der einfachen Aldehydmoleküle wäre. Natürlich kann gegebenenfalls auch eine andere zur intermediären Hydrat-

¹⁾ Liebig, Ann. d. Chem. 30 (1839) 260, 280, 363 und 367; siehe den Allg. Teil im Abschnitt über die induzierten Reaktionen.

bildung befähigte Gruppe, wie die in die Ammoniumhydroxydform übergehende Aminogruppe, dieselbe Wirkung besitzen.

Wenn nun aber auch nach Liebig's Theorie der induzierten Reaktionen die spaltende Wirkung der Fermente auf ein Substrat darin zu suchen ist, daß sie sich selbst spalten, so ist damit noch keine Erklärung gegeben, wie sich die Uebertragung der molekularen Veränderung vom Ferment auf das Substrat vollzieht. Ebenso bleibt für den polymeren Formaldehyd die Frage offen, wodurch seine eigene Depolymerisation die Depolymerisation der Stärke nach sich zu ziehen vermag.

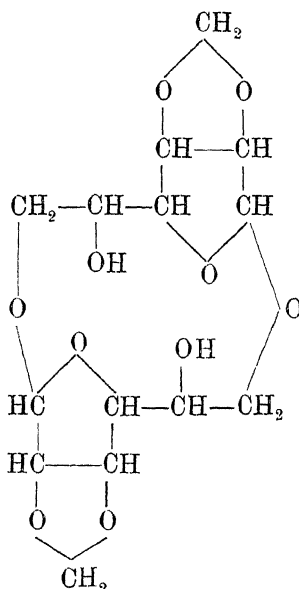
Hier könnte nun das Moment der Bildung einer intermediären Verbindung zwischen Formaldehyd und Stärke und Diastase und Stärke ergänzend eingreifen.

Natürlich bedeutet Bindung und Spaltung keinen Gegensatz, denn auch die Fermente binden sich ja an die Substrate, ehe sie sie spalten. Eine fermentative Fernwirkung kennen wir nicht. Der Nachweis einer Bindung an Stärke beim Formaldehyd würde nur ein Analogiemoment mehr zwischen Diastase und Formaldehyd darstellen. Ja gerade die Bildung dieses Zwischenproduktes kann die Möglichkeit für eine Spaltung der Stärke erst eröffnen. Verbindet sich polymerer Formaldehyd mit Stärke, so bedeutet dies nicht nur für ihn selbst einen Zerfall in die Moleküle des zugrunde liegenden freien Aldehyds, sondern der Bindungsvorgang zerreißt auch die Partialvalenzen oder assoziativen Kräfte, die in der nativen Stärke das Ringsystem der Diamylose zu einer polymeren Diamylose, einer Tetra- oder Hexamylose zusammenhalten. Die kristallisierte Formaldehyd-Stärke von Klassen und Syniewski, die sonderbarerweise als Argument gegen eine Spaltung ins Feld geführt worden ist, dürfte daher auf gleiche Stufe zu stellen sein wie die kristallisierten Dextrine, die Amylosen, welche Schardinger und Pringsheim unter dem Einfluß des *Bacillus macerans* aus der Stärke erhielten.

Die Depolymerisation der Stärke könnte sich nach demselben Modus vollziehen, wie ihn Karrer durch Methylierung der Stärke bewerkstelligt hat. An Stelle des Tetramethyläthers der Amylose entstände der entsprechende Dimethylenäther (siehe Formel S. 531).

In einer solchen Verbindung sind die vier nach außen liegenden Hydroxylgruppen, wie im Tetramethyläther der Diamylose von Karrer, chemisch gebunden. Da aber die Hydroxylgruppen die Träger des Assoziationsvermögens sind, welches die Moleküle zu kolloiden Aggregaten und zum Stärkesphärokristall zusammenschweißt, so fehlt der Verbindung das Vermögen der Blaufärbung mit Jod, welches an das

Vorhandensein von assoziierter Stärke gebunden ist. Denn die beiden noch freien Hydroxyle dürften nach innen gelagert sein und somit durch das große Ringsystem der Substitution und andern chemischen Eingriffen, wie auch der Betätigung ihres Assoziationsbestrebens entzogen sein.



Zum Unterschied vom Methyläther Karrers ist der Methylenäther, wenn er, wie ich annehme, der kristallisierten Verbindung von Klassen und Syniewski entspricht, unbeständig. Hierauf beruhen nun zwei einander entgegengesetzte Vorgänge:

1. Die Rückbildung der Polyamylose aus der Diamylose. Denn in dem Maß, als bei der hydrolytischen Spaltung neben Formaldehydhydrat Diamylose entsteht, macht sich die Assoziationstendenz der nunmehr freien Hydroxyle geltend. Es bilden sich assoziierte Amylosen, und damit erlangt das System wiederum die Fähigkeit zur Blaufärbung mit Jod. Daher die Erscheinung der Rückbläue beim Stehen, die durch Erhitzen, durch Wasserstoffionen und durch mehrwertige Kationen noch beschleunigt werden kann, weil diese Faktoren die Ausfällung der gröber dispersen Teile des Systems, respektive der höher assoziierten mit Jod sich bläuenden Molekülaggregate und damit deren Nachlieferung aus weniger aggregierten Komplexen nach dem Massenwirkungsgesetz begünstigen.

2. Die hydrolytische Weiterspaltung des Diamyloserings zur Maltose unter Öffnung einer Sauerstoffbrücke, wobei die elementaren

Formaldehydmoleküle durch Bildung des intermediären Hydrats, — bzw. das hydrolytisch aus dem erwähnten Methylenäther abgespaltene Formaldehydhydrat, — wie früher ausgeführt, als Wasserüberträger wirken.

Die Weiterspaltung der freien Diamylosemoleküle müßte in dem Moment einsetzen, wo sie durch Hydrolyse des unbeständigen Methylenäthers frei werden. Wird dieser Moment verpaßt, so verschlechtern sich die Bedingungen für die Weiterspaltung in dem Maß, als sich die freie Diamylose assoziiert. Daher die Beobachtung von H. Maggi¹⁾, daß an gestandenen Stärke-Formaldehydlösungen die Zuckerreaktionen schlecht oder gänzlich negativ ausfallen. Daher die Beobachtung desselben Autors, daß bei Anwendung der Beckmannschen Gefrierpunktsbestimmungsmethode auf Formaldehyd-Stärkegemische das Gemisch zwar einen tieferen Gefrierpunkt besitzt als dem kryoskopischen Mittelwert der Komponenten entspricht²⁾, daß aber die sofort nach dem Mischen ausgeführte Bestimmung nach Beckmann einen tieferen Gefrierpunkt liefert als ein zuvor $\frac{1}{2}$ Stunde im Wasserbad von 33° gestandenes Gemisch³⁾.

Noch auffallender ist der Rückgang nach längerem Stehen, namentlich wenn noch die assoziationsbegünstigende Wirkung der höheren Temperatur hinzukommt. Eine vollständige Rückkehr zu der Gefrierpunktserniedrigung, wie sie der 10fach verdünnte Formaldehyd allein zeigt, kann jedoch nicht beobachtet werden, — ein Beweis dafür, daß ein Teil der Diamylosemoleküle sich nicht zur Stärke zurückbildet, sondern weiter gespalten wird oder zum mindesten in depolymerisierter Form erhalten bleibt, vielleicht nach Umlagerung in β -Amylose.

Die bei der Kryoskopie an nicht ganz frisch hergestellten Formaldehyd-Stärkegemischen erhaltenen Resultate deuten also wie die Rückbläunung, wie das von Karrer an erhitzten Diamyloselösungen festgestellte Auftreten des Tyndallphänomens an der zuvor optisch leeren Lösung, wie das Auftreten ultramikroskopisch, mikroskopisch und selbst makroskopisch sichtbarer Trübungen auf das Wachstum der in der Lösung befindlichen Polyamyloseiteilchen auf Kosten ihrer Zahl hin. — Die Geschwindigkeit der beiden Simultanreaktionen: Assoziation und hydrolytische Ringöffnung der Diamylose bestimmt das weitere Verhalten der Formaldehyd-Stärkegemische.

Vollzieht sich die Assoziation sehr rasch, wie unter dem Einfluß von Temperaturerhöhung und bei Gegenwart von Kationen, die sich, wie das Wasserstoffion, durch hohe Wanderungsgeschwindigkeit auszeichnen oder die mehrwertig sind oder eine geringe elektrolytische Lösungstension besitzen (und die, vermöge dieser Eigenschaften, eine durch kolloidchemische Ausfällung der höher aggregierten Molate bedingte Gleichgewichtsverschiebung des Systems zugunsten der gröber dispersen Teile verursachen), so sind die Aussichten für die weitere Spaltung gering, während bei einer langsamen Assoziation mehr Diamylosemoleküle die Chance haben, weiter zu zerfallen.

Die Bildung von Diamylosemethylenäthern würde auch erklären, warum von Samec und Anka Mayer⁴⁾ nicht nur keine Gewichtsabnahme, sondern

¹⁾ H. Maggi, Fermentforschung 2 (1919) 337 ff.

²⁾ Würde es sich bei der Einwirkung von Formaldehyd auf Stärke nur um eine Bindung ohne Folgeveränderung handeln, so wäre das Gegenteil der Fall.

³⁾ H. Maggi, loc. cit. vorletzte Fußnote, 365 und 367

⁴⁾ Samec und Anka Mayer, Kolloidchem. Beihefte 13 (1920) 190.

eine recht beträchtliche Zunahme des Trockengewichts festgestellt werden konnte. Diese Zunahme ist eine gesetzmäßige, die in der Weise von der Formaldehydkonzentration abhängt, daß mit der Verdoppelung der Formaldehydmenge die Gewichtszunahme der Trockensubstanz um genau das Anderthalbfache steigt. Eine solche Regelmäßigkeit kann nicht durch eine Beimischung von polymerem Formaldehyd zum Niederschlag verursacht sein, wie unter anderem Samec angenommen hat. Sie deutet vielmehr auf eine Bindung nach stöchiometrischen Verhältnissen hin und in der Tat können die von Samec gefundenen Trockengewichtszunahmen wenigstens zum Teil auf diesen Umstand zurückgeführt werden. Bei der Diamylose würde sich bei einer Bildung des partiellen Methylenäthers eine Trockengewichtszunahme von 5,99 %, für die Bildung des totalen 8,98 % berechnen und dies würde genau einer Zunahme um das Anderthalbfache entsprechen. Samec hat aber auch Trockengewichtszunahmen gefunden, die über die bei einer Bindung zwischen Formaldehyd und Stärke ohne Ringaufspaltung maximal erreichbare hinausgehen — bis zu 12 % des Gesamtgewichts —, und solche Befunde dürften sich wohl durch die Wasserfixierung der partiellen Desaggregations- und Depolymerisationsprodukte unter Oeffnung des Diamyloserings erklären. Die erwähnten Befunde von Samec stehen also jedenfalls nicht in Widerspruch mit einer spaltenden Wirkung des Formaldehyds gegenüber der Stärke. Dasselbe ist auch der Fall für das von Wohlgemuth¹⁾ festgestellte Verhalten, daß bei Zusatz von alkoholischem Phenylhydrazin der entstandene Niederschlag keinen Gewichtsverlust gegenüber dem Ausgangsmaterial erkennen läßt. Findet nur, wie beim *Bac. macerans*, eine Aufteilung der Stärkeaggregate statt, so braucht noch kein Grund für eine Gewichtsabnahme gegeben zu sein. Aber auch eine geringgradige Aufspaltung zur leichtlöslichen Maltose kann kompensiert und überkompensiert werden durch eine Wasserfixierung, indem — wie das Reduktionsvermögen mancher dextrinartiger, wasserunlöslicher oder schwerlöslicher Stoffe beweist — neben der Depolymerisation auch schon die erwähnte Hydrolyse des noch zu Molekülaggregaten assoziierten Diamyloserings einherläuft.

Die Verhältnisse liegen hier ganz ähnlich wie bei der Einwirkung von Lab auf Eiweiß. Auch hier hatte man ja, wie im Abschnitt über die Labwirkung ausgeführt wurde — aus dem nämlichen Grunde wie bei der Formaldehyd-Stärkereaktion —, lange Zeit daran gezweifelt, daß die Labwirkung als eine Proteolyse aufzufassen sei, da Hillmann²⁾ festgestellt hatte, daß der erhaltene Parakaseinniederschlag keinen Gewichtsverlust gegenüber dem Ausgangsmaterial zeigt. Andererseits ist für die tiefere Aufspaltung, wie sie das Trypsin vermittelt, von Danilewsky³⁾ und Hári⁴⁾ die stattgefundene Hydrolyse bei der Eiweißspaltung gerade durch die Zunahme des Trockensubstanzgewichtes bewiesen worden. Nichts berechtigt zu der Annahme, daß für die Formaldehyd-Stärkereaktion aus der Zunahme des Trockensubstanzgewichtes der entgegengesetzte Schluß gezogen werden darf wie für die Trypsinspaltung des Eiweiß. Mit der Wasserfixierung, gleichgültig ob sie am freien Diamylosering oder an

¹⁾ Wohlgemuth, *Biochem. Zeitschr.* 99 (1919) 316.

²⁾ Hillmann, *Mitteil. d. landwirtsch. Instituts der Universität Leipzig* (1897) 113; *Milchztg.* 25, 86.

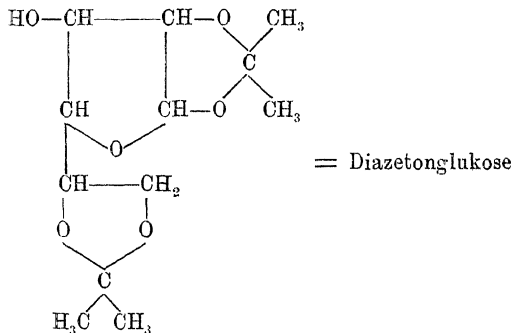
³⁾ Danilewsky, *Zentralbl. f. n. med. Wissensch.* (1880) 769.

⁴⁾ Hári, *Archiv f. d. ges. Physiol.* 115 (1906) 11.

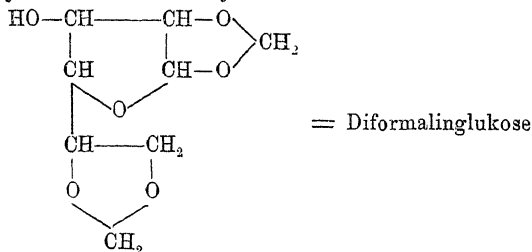
dessen Aggregaten einsetzt, hängt die Reduktionswirkung des Systems wie Ursache und Wirkung zusammen. Die Stärke-Formaldehydgemische lassen ein Optimum für die Reduktion bei einer bestimmten Formalinkonzentration erkennen. Dies wäre unmöglich, wenn der Formaldehyd nur bindend auf die Stärke wirkte und keine Stoffe mit eigenem Reduktionsvermögen aus diesem Substrat entstehen würden. Die Bindung an Stärke könnte nur eine von dem gegenseitigen Mengenverhältnis der Komponenten abhängige Abschwächung der Reduktionswirkung verursachen. Eine Zunahme der Reduktionswirkung ohne gleichzeitige Verzuckerung oder Dextrinisierung von Stärke anzunehmen, ist absolut ausgeschlossen. In Wirklichkeit nimmt jedoch das Reduktionsvermögen einer bestimmten Formaldehydmenge beim Zumischen von Stärke niemals ab, sondern meist im Gegenteil zu.

Während die Bildung einer intermediären Verbindung, sei es bei der Diastase, sei es beim Formaldehyd, im Sinne der hier vertretenen Auffassung, mit der Stärkespaltung ursächlich verknüpft ist, steckt in der analogen Bindung zwischen dem Ferment oder dem Formaldehyd und den Spaltprodukten ein den Nachweis der Spaltung sehr erschwerendes Moment.

Daß es sich bei der Einwirkung von Formaldehyd auf Maltose, Glukose, wie auch auf andere Zucker um die Bildung von mehr oder weniger unbeständigen Methylenäthern handelt, ist umso wahrscheinlicher, weil Derivate der hier zu erwartenden Verbindungen von Karrer und Hurwitz¹⁾ durch die Einwirkung von Azeton auf Zucker erhalten worden sind. So wäre die Diazetonglukose, der Karrer und Hurwitz die Formel zuschreiben:



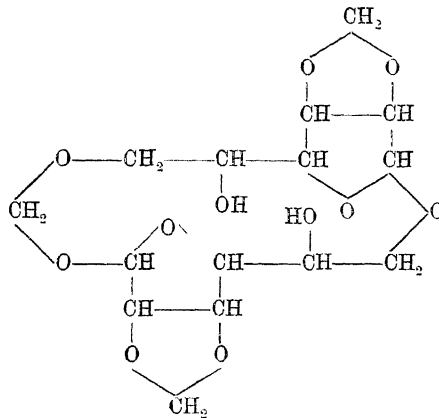
ein Tetramethylderivat des Dimethylenäthers der Glukose:



In analoger Weise lassen sich verschiedene Methylenäther der Maltose ableiten, so z. B. der dem ringförmigen Maltoseanhydrid entsprechende Maltose-

¹⁾ Karrer und Hurwitz, *Helv. chim. acta* 4 (1921) 728.

trimethylenäther, der vielleicht auch durch direkte Sprengung des Ringsystems der Diamylose durch Formaldehyd entstehen könnte.



Bei den einfachsten Methylenäthern, bei welchen die Aetherbildung nur auf Kosten orthoständiger alkoholischer Hydroxyle erfolgt, dürfte lediglich der Zuckergeschmack eine mehr oder weniger weitgehende Maskierung erfahren. Neben einem leicht süßlichen Geschmack macht sich ein fader, anhydrozuckerartiger Beigeschmack geltend oder es werden auch ausgesprochen bitter schmeckende Gemische durch Vermischen von Formaldehyd mit Maltose oder Glukose erhalten¹⁾.

Die im Geschmack veränderten Gemische, bzw. die bei der Mischung gebildeten Methylenäther, können ihr volles Reduktionsvermögen bewahrt haben. Eine Abschwächung des letzteren beweist, daß nicht nur die alkoholischen Hydroxyle, sondern außerdem die freie Hydroxylgruppe im endständigen Laktoring der Maltose vom Formaldehyd mit Beschlag belegt worden ist.

Die gegenseitige Bindung der beiden Reduktoren, Formaldehyd und Zucker, bildet auch die einfachste Erklärung für die zuerst von H Maggi festgestellte Tatsache, daß das Reduktionsvermögen von Formaldehyd-Maltosegemischen im Vergleich zum Reduktionsvermögen der beiden Komponenten bei einer bestimmten Formalinkonzentration ein Optimum aufweist. Dasselbe konstatierten dann später v. Kaufmann, Lewite, Jacoby und Sallinger auf Grund eines Versuchs von Sallinger. Diesen Versuch betrachten die letzteren als einen Beweis gegen meine Ansicht einer Maskierung der Zuckereigenschaften durch den Formaldehyd, während er in Wirklichkeit in allen wesentlichen Punkten gerade die auf der gegenseitigen Bindung basierende Maskierung der Zuckereigenschaften stützt, denn nur eine Bindung vermag ein durch Maxima und Minima gekennzeichnetes, vom arithmetischen Mittel des Reduktionsvermögens der Komponenten stark abweichendes Verhalten zu erklären, wenn man nicht eine glykolytische Wirkung des Formaldehyds auf den Zucker annehmen will. In dieser Hinsicht interessieren

¹⁾ Zucker-Formaldehydgemische von verändertem Geschmack können in der Weise hergestellt werden, daß Maltose in ein mit Formalin zu zwei Dritteln gefülltes Schälchen eingerührt wird. Die so erhaltene dicke Masse verflüssigt sich bei mäßiger Temperaturerhöhung wieder zu einem dicken Sirup, der im Verlauf von zirka 8 Tagen zu einer leimähnlichen Masse eindunstet.

Feststellungen von Kobert über die diastatische Wirkung von Spinnenextrakten¹⁾. Untersuchte Kobert frisch hergestellte Auszüge lebender Spinnen, so fiel der Zuckernachweis nach 1—2tägiger Einwirkung auf Stärke negativ aus. Dagegen gelang der Zuckernachweis immer mittelst Extrakten aus eingetrockneten Exemplaren, selbst wenn dieselben schon mehrere Jahre eingetrocknet waren. Kobert hat zur Erklärung dieser Differenz die interessante Hypothese aufgestellt, daß bei den frischen Exemplaren ein glykolytisches Enzym den gebildeten Zucker zerstöre, während diese Zymase durch die Aenderungen beim Eintrocknen der Tiere zugrunde gehe. Es entsteht daher auch für die Einwirkung von Formaldehyd auf Stärke die Frage, ob der gebildete Zucker durch eine glykolytische Wirkung des Formaldehyds beseitigt werden könnte, eine Frage, die mit Rücksicht auf den enorm begünstigenden Einfluß, welchen Neuberg²⁾ für Aldehyde gegenüber der alkoholischen Gärung des Zuckers feststellen konnte, noch an Interesse gewinnt. Ich muß jedoch betonen, daß es mir nie gelang, eine Glykolyse an Traubenzucker-Formaldehydlösungen, die in Gärungsröhrchen eingefüllt waren, durch eine stattfindende Kohlensäureentwicklung festzustellen. Wohl aber kann man sich in der angegebenen Weise von der wechselseitigen Hinderung leicht überzeugen, welche der Formaldehyd auf Zuckerreaktionen, z. B. auf Reduktionsproben, und umgekehrt Glukose oder Maltose auf Formaldehydreaktionen, ausübt, so bei der Oxydation von Benzidinchlorhydratlösungen durch das peroxydaseähnliche System $H_2O_2 + H-CH=O$ ($H-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{CH}}}-O-OH$ oder nach

Wasseraustritt $H-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{CH}}}$). Daß es dabei nicht zu einer so weitgehenden Hinderung

der Reduktionswirkung kommt, wie bei der Einwirkung von Formaldehyd auf Stärke, ist von nebensächlicher Bedeutung und dürfte seine Erklärung in der ungleichen Formaldehydbindungsfähigkeit der primär aus der Stärke entstehenden und der stabilen Umlagerungsformen der Zucker finden.

Ich möchte daher für den Formaldehyd nicht eine glykolytische Wirkung, sondern eine chemische Bindung an den Zucker im Sinne der obigen Ausführungen ins Auge fassen. Für die frischen Spinnenextrakte, wo ein Beweis für die Glykolyse auch noch aussteht, könnte die Annahme einer Bindung der Diastase an den bei der Stärkespaltung gebildeten Zucker ebenfalls für den negativen Ausfall der Zuckerreaktionen verantwortlich gemacht werden. Doch dürfte bei den frischen Spinnenextrakten wie beim gewöhnlichen Formaldehyd die Wirkung auf Stärke überhaupt nur eine wenig ausgeprägte sein. Erst durch die Aenderungen, welche die Spinnendiastase beim Eintrocknen der Tiere erfährt, wird sie, gerade so wie das eintrocknende Formalin, zu einer so kräftigen Wirkung auf Stärke befähigt, daß hier wie dort der Zuckernachweis ohne Schwierigkeit erfolgen kann. Die Analogie zwischen den Wirkungsbedingungen des Formaldehyds und der Spinnendiastase, der sich andere Diastasen der Wirbellosen an-

¹⁾ Siehe den Abschnitt Arachniden in Biedermanns ausgezeichnetem Beitrag zu Wintersteins Handbuch d. vgl. Physiol. der Tiere 2, 1. Hälfte, 2. Teil (Jena 1910); siehe auch Kobert, Pflügers Arch. 99 (1903).

²⁾ Siehe die zahlreichen Arbeiten über diesen Gegenstand in der Biochem. Zeitschr. des letzten Jahrzehnts, welche in der demnächst erscheinenden 2. Hälfte der Biologischen Katalysatoren im Abschnitt Zymasen besprochen sind.

reihen lassen, ist eine so auffallende, daß sie wohl auch denjenigen einleuchten muß, die sie bisher, mit Rücksicht auf die starken quantitativen Differenzen, welche die stärke-spaltenden Fähigkeiten des Formaldehyds, verglichen mit besonders kräftig wirkenden Diastasen der Wirbeltiere zeigen, abgelehnt haben. Mit Rücksicht auf die erwähnte Analogie muß es von besonderem Interesse sein, der nicht geringen Anzahl von Fällen, namentlich bei den Wirbellosen, nachzugehen, wo sich dieselbe auffallende Diskrepanz zwischen dem Ausfall der Jodreaktion und den Zuckerreaktionen geltend macht, wie bei den Extrakten frischer Spinnen und beim Formaldehyd. Wenn sich hierbei — eingerechnet den *Bac. macerans* mit seiner ausschließlich depolymerisierenden Wirkung — durch Eintrocknen eine solche Wirkungssteigerung der stärke-spaltenden Prinzipie erzielen läßt, daß sie bis zur ausgesprochenen Zuckerbildung führt, so dürfte es wohl in allen Fällen die an die Aldehydgruppe gebundene Polymerisationsfähigkeit eines Stoffes sein, welche die Voraussetzung für das in der Depolymerisation desselben gegebene spaltende Moment erst schafft. Das beim Eintrocknen gebildete Polymerisat wäre gewissermaßen geladen mit einer bestimmten, vom Polymerisationsgrad abhängigen Energie, die in der nachfolgenden Depolymerisationsphase wieder frei wird und in der Spaltung der hinzutretenden Stärke zur Auswirkung gelangt.

Sachregister.

- Abderhaldenreaktion (siehe Abwehrfermente und Graviditätsreaktion).
- Abwehrfermente 3. 20—22. 30. 31. 54. 70. 113. 216. 217. 220. 235. 242. 325. 334. 351. 357. 358. 368—397. 443. 464. 465. 466.
- Abwehrfermentuntersuchungsmethoden (siehe Abwehrfermente).
- Fehlerquellen derselben 381. 383 bis 389.
- Abwehrproteasen (siehe Abwehrfermente)
- Achromischer Punkt 103.
- Addison'sche Krankheit 377—379.
- Adenase 442—445. 450. 451.
- Adenaseermittlung 443. 444.
- Adenin 442—444. 446. 447. 450. 451. 454.
- Adeninermittlung 444.
- Adrenalin 450.
- Adsorptionsbindungen bei der Antikörperwirkung 425.
- bei der Toxinwirkung 467.
- Adsorptionsvermögen der Stärke 113.
- Adsorption von Enterokinase an rote Blutkörperchen 306.
- von Enterokinase an Serumprotein 305.
- von Fibrinferment an Fibrin 292.
- von Fibrinferment an Serumprotein 311.
- von Lipasen an Ester 504.
- zwischen Ferment und Substrat 213. 305. 306. 497. 504.
- Aethylazetatverseifung 212. 213. 495. 497.
- Aethylbutyrat (siehe Buttersäureäthylester).
- Agglutination 259. 279. 334. 335. 340 bis 344. 348. 352. 371. 434.
- Anwendung zur Typhusdiagnose 341 bis 343.
- Anwendung zur Untersuchung von Bakterien mit bekanntem Sera 343. 344.
- Anwendung zur Untersuchung von Sera mit bekannten Bakterien 341 bis 343.
- Agglutinin (siehe Agglutination).
- Aggregation (siehe Assoziation).
- Akromegalie 377.
- Aktivierung, fermentative 24. 25. 46 bis 51. 59. 65. 66. 75. 86—92. 137—139. 151. 152. 159. 161. 185. 188. 190. 217. 231—233. 246—249. 260. 261. 266 bis 273. 279—282. 288. 291. 296. 297. 299. 302—309. 314. 333. 340. 461. 474. 479 bis 482. 484. 494—496. 502. 503.
- durch Beeinflussung des Dissoziationszustandes 48—51. 188. 189. 191.
- durch Beeinflussung des kolloiden Zustandes 25. 46—48. 92. 138. 247—249. 266—272. 279—282. 288. 296—299. 503.
- von autolytischen Fermenten durch Arsenverbindungen 248. 249.
- von autolytischen Fermenten durch Jod 248.
- von autolytischen Fermenten durch kolloide Metalle, Metallhydroxyde und Salze 248. 249.
- von autolytischen Fermenten durch Narkose 247.
- von autolytischen Fermenten durch Phosphor 248.
- von autolytischen Fermenten durch Säuren 246. 247.
- von autolytischen Fermenten durch Selenverbindungen 249.
- von autolytischen Fermenten durch Toxine 249.
- von Blutprotease 381.
- von Diastasen durch Antipyretika, Antiseptika, Narkotika usw. 92.
- von Diastasen durch ihre Begleitstoffe 137—139.
- von Emulsin durch Licht 152.
- von Emulsin durch Säuren 151.
- von Endotryptase durch Salzsäure 237.
- von Lab durch Dialyse 266.
- von Lipasespaltungen durch Alkalien 502.

Aktivierung von Lipasesynthesen durch Säuren 502.
 — von Lipasewirkungen 24. 460—464. 473—475. 479—482. 484. 494—496. 502 503. 505.
 — von Oxydationsprozessen durch Alkali 247.
 — von Pankreasamylsalizylase und anderen Esterasen durch gallensaure Salze 494. 496.
 — von Pankreaslipase durch Galle 461. 462. 464. 475. 479. 480. 494.
 — von Pankreaslipase durch Gallensauren 461. 462. 464. 475. 494. 496.
 — von Pankreaslipase durch Kalksalze 481.
 — von Pankreaslipase durch Neutralsalze 24.
 — von Pankreaslipase durch Organpreßsäfte 481.
 — von Pankreaslipase durch Pankreassaftdialysat 481.
 — von Pankreaslipase durch Säuren 482. 484.
 — von Pankreaslipase durch Serum 24. 481.
 — von Pepsin-Labzymogen durch Salzsäure 260. 261. 280. 281. 333 (siehe auch Aktivierung von Zymogenen).
 — von Pepsinspaltungen durch H-Ionen 273. 279. 340. 502.
 — von Peptasen durch Alkali 232. 233.
 — von Peptasen durch Chlorkalzium 232.
 — von Peptasen durch Fluornatrium 232.
 — von Peptasen durch Normalserum 231.
 — von Peptasen durch schwache Sodalösungen 233.
 — der Phytolipasen durch Säuren 473. 474. 481.
 — der Phytolipasen durch Wasser 502.
 — von β -Proteasen der Organe durch schwache Säuren 233.
 — von Ptyalin durch Mineralstoffe des Speichels 24. 89. 90. 115.
 — von Thrombogen (Prothrombase) durch Kalksalze 291. 296. 297. 299. 301.
 — von Thrombogen durch Thrombo-kinase 297. 299. 302—305. 307. 308. 309.
 — von Toxinen durch Meerschweinchenkomplement 352.
 — von Trypsin durch Aminosäuren 161.
 — von Trypsin durch Erepsin 352.
 — von Trypsin durch Kalziumsalze 297.
 — von Trypsin durch kolloide Farbstoffe 299.
 — von Trypsin durch OH-Ionen 279.
 — von Trypsinogen durch Bakterien 314.
 — von Trypsinogen durch Chlorkalzium 231.

Aktivierung von Trypsinogen durch Darm-saft oder Darmschleimhautextrakte 231. 232.
 — von Trypsinogen durch Enterokinase 231. 261. 304—306. 308. 309.
 — von Urease durch Kohlensäure 437.
 — von Zymogenen 260. 261. 280 bis 282. 291. 296. 297. 299. 302—309. 314. 333. 340. 461. 474. 479. 481.
 d-Alanyl-d-Alanin 225. 226.
 Alanyl-glyzin 172. 230.
 Alanyl-glyzyl-glyzin 172.
 d-Alanyl-l-Leuzin 226.
 Albumine 163. 170. 237. 249. 257. 276. 315. 316. 320. 330. 352. 363. 384. 399.
 Albumosehemmung der Blutgerinnung 294. 295. 309. 321.
 — der Milchgerinnung 257. 258. 321.
 — der proteolytischen Eiweißverdauung 318. 321 (siehe auch Spaltprodukt-hemmung).
 Albumosen (siehe Polypeptide).
 Aldehydhydrate 11. 118. 119. 122. 529. 532.
 Aldehydwirkung auf die alkoholische Gärung 536.
 Alkaleszenzschwankungen im Blut 490.
 Alkoholyse 500.
 Alveolen 397. 400.
 Ambozeptor 279. 304—308. 310—312. 334. 344. 348. 352. 353. 363. 365. 373. 386. 472.
 Amidasen 31. 248. 434—452. 495.
 Amide und Amine 434—437.
 Amidspaltung 434. 435.
 Aminosäuren 160. 162. 167—170. 172 bis 175. 180. 185. 209. 218—220. 225—227. 231. 233. 241—243. 318. 380. 383. 396. 403. 416. 417. 420. 435. 474.
 Ammoniakbestimmung nach Schlösing 437. 438.
 Ammoniumkarbonatgewinnung aus Harnstoff 436—438.
 Amphopepton (Kühne) zur Erepsinermittlung 235. 236.
 Amygdalase (siehe Emulsin).
 Amygdalin (siehe Amygdalose).
 Amygdalinspaltung (siehe Emulsin).
 Amygdalinsynthese (siehe Emulsin).
 Amygdalose 33. 37—39. 76. 141. 142. 148.
 Amylase (siehe Diastase).
 Amylbutyrat 502. 503.
 Amylokoagulase 93. 113. 138. 140. 523. 527.
 Amylopektin 111. 123. 124. 140. 511.
 Amylopektinbildung aus Amylose 511.
 Amylophosphorsäure 111. 140.
 Amylose Maquennes 511.
 Amylosen 111. 121. 122. 140. 507—516. 518—520. 522—525. 529—533.

α -Amylosen 508. 523.
 β -Amylosen 508. 509. 523. 532.
 Amyloseumwandlung in Amylopektin 511.
 Amylsalizylase 493—495.
 Amylsalizylaseaktivierung 494.
 Amylsalizylasedarstellung (siehe Lipasepräparate).
 Amylsalizylat 493. 494. 496.
 Anaphylaxie 279. 310. 335. 337. 347—351. 353—358. 368—370. 377. 383.
 Anaphylatoxine 351. 358.
 Anhydromaltose (siehe Maltoseanhydrid).
 Anhydrotetrifruktose 520. 521.
 Anpassung von Lipasen an die Reaktion des Mediums 503.
 — von Lipasen an die sauren Spaltprodukte 502. 503.
 Antagonisten (siehe Selbstregulierung vitaler Reaktionen).
 Antianaphylaxie 369. 370.
 Anti-antilab 325.
 Antidiastase 93.
 Antiemulsum 152. 153.
 Antienzyme (siehe Antifermente).
 Antifermente 26. 28. 54. 72. 93. 135. 152. 153. 231. 258. 264. 299. 306—308. 311. 314—328. 331. 334. 346. 376.
 Antifibrinferment (siehe Antithrombine).
 Antigen 351. 369. 422. 423. 425. 427 bis 429.
 Antiinulinase 135.
 Antikinasen 299. 307. 308.
 Antikörper 26—29. 54. 72. 93. 135. 152. 153. 231. 259. 264. 305. 307—309. 311. 314—328. 331. 334—348. 350. 353 bis 360. 362—367. 369. 422—430. 432. 434. 469.
 Antilab 26. 264. 319. 320. 328. 331.
 Antilabermittlung 331. 332.
 Antilaktase 72.
 Antileukoprotease (siehe Antifermente).
 Antilysin der Bakterien 434.
 Antimenschenserum (siehe Antiserum).
 Antimeristem 468.
 Antipepsin 26. 316. 318. 319. 325. 332 bis 334.
 Antipepsinermittlung 332—334.
 Antiproteasen (siehe Antifermente).
 Antiserum 336—340. 345. 363. 364. 366. 368. 371.
 — Gewinnung desselben 337. 338. 363. 364. 366.
 — Verwendung desselben 337—339. 363 bis 366.
 Antithrombine 307. 317. 370.
 Antitoxine 26—29. 319. 325. 343. 355. 356. 426. 427. 432. 434.
 Antitrypsin 231. 261. 282. 308. 314—319. 321—328. 332. 346. 347. 376. 377. 469.

Antitrypsin, klinische Bedeutung 321 bis 325.
 Antitrypsinermittlung 325—328. 376.
 Antitrypsinhemmung der Tumorerlösung 376. 377. 469.
 Arachniden 407—413. 417. 536. 537.
 Arachnideneiweiß 407—411.
 Arginase 438. 439.
 Arginasedarstellung 439.
 Arginaseermittlung 439.
 Arginin 416. 436. 438. 439.
 Arsentsulfidfallung durch Ionen 512.
 Artfremdes Eiweiß (siehe Eiweiß, artfremdes).
 Askaridenextrakthemmung auf die Blutgerinnung 309.
 — auf die tryptische Spaltung 309. 314.
 Assimilation von Kohlensäure 150. 514.
 — von Nitraten 150.
 Assoziative Kräfte (siehe Assoziation).
 Assoziation 508. 511. 512. 521. 523. 530 bis 534.
 Assoziationsgrad 511.
 Assoziationsgradherabsetzung (siehe Desassoziationsprozesse).
 Asymmetrische Spaltung (siehe Assoziation).
 Asymmetrische Spaltung 498.
 Atmung, innere 247.
 Atmungsfermente (siehe Oxydasen).
 Anfallserscheinungen bei Drüsenerkrankungen 378. 379.
 Ausflockung (siehe Koagulation).
 Autoexzitation von Malzextrakt 87.
 Autohamolysin 424.
 Autokatalyse 437. 474.
 Autolysate von Organen als Plasteinbildner 329.
 Autolyse 238—251. 294. 312. 316. 317. 324. 329. 349. 397. 398. 403. 414—416. 432. 440. 448. 466.
 — aseptische 245.
 — bei der Sekretbildung 403. 414. 415.
 — bei pathologischen Organveränderungen 240—242.
 — im Hunger 240. 244.
 Autolysbeeinflussung 240. 246—249. 324.
 Autolyseermittlung bei Organen 242 bis 244.
 — mittels der Kjeldahlmethode 242. 243.
 Autolyselatenzperiode 240.
 — Nachweis durch Leitfähigkeit und Gefrierpunktserniedrigung 240.
 Autolyse von Exsudaten 249.
 — von Organen 242—244. 294. 314. 315.
 — von Tumoren 249.
 Autolytische Fermente (siehe Autolyse).
 Autolytische Spaltprodukte als Hemmungstoffe der Blutgerinnung 294. 316. 317.
 Autophagozytose (siehe Phagozytose).

Auxanographische Methode 36. 40. 72.
Azidalbumin 214.

Bacillus fluorescens, liquefaciens und
pyocyaneus 471.

— *macerans* 127. 221. 512. 518. 521. 525.
530. 533. 537.

Bakterienagglutinine (siehe Agglutination).
Bakterienweis (nach Baccilli 1907).

Bakteriolyse 278. 340. 344—346. 350. 351.
353. 355. 357. 359. 362. 372. 373. 432
bis 434. 465. 471. 472.

Bakteriophage 430—434.

Bakteriozidie 278. 309—312. 316. 334.
344—346. 353. 359. 360. 362. 371. 372.

Bakteriozidine (siehe Bakteriozidie).

Bakteriozidine, leukozytare (siehe Leuko-
zytenproteasen).

Bandwurmlipoide (siehe Lipoide).

Bangsche Losung und Verfahren zur
Zuckerbestimmung 98. 99.

Barbonebakterien 432.

Barfoedsches Reagens 68. 71. 518. 519
(siehe auch Barfoed).

— Anwendung zur Differenzierung von
Hexosen und Bienen 68. 71. 518. 519.

— Zusammensetzung 68.

Basedow 377—379. 470.

Bazilleneiweiße 335. 341. 342. 378 bis
380. 383.

Bazillus Flexner (siehe Dysenterie-
bazillen).

— *Shiga-Komplex* (siehe Dysenteriebazillen).

Bence-Jonesche Albuminurie 373.

Benzaldehydperoxyd 9.

Benzaldehydzynhydrin 141. 142.

Benzidinchlorhydrat 536.

Benzoesaure 435.

Benzoesauremethylester 494.

Benzcyanase (siehe Oxynitrilase).

Bienenmageneiweiß (siehe Eiweiß des
Bienenmagens).

Bindung zwischen Ferment und Substrat
(siehe Adsorption).

Birotation (siehe Multirotation).

Biuretbase (siehe Triglyzyl-glyzinester).

Biuretreaktion 167. 170. 172. 220. 235 bis
238. 325. 372. 384. 390.

Blutbildende Organe 422. 423.

Blutfarbstoff (siehe Hämoglobin).

Blutgerinnung 290—304. 309—312. 316.
317. 320. 321. 334. 340. 370.

Blutgerinnungsschema 297.

Blutkörperchen (siehe Erythrozyten und
Leukozyten).

Blutkörperchenproteasen 386.

Blutlipase 459—464. 469—472. 484. 488
bis 492. 496. 497. 499. 501.

Blutlipascermittlung mittels Tributyrin
492.

Blutnachweis, forensischer 337. 338. 365.
366.

Blutphytase (siehe Blutlipase).

Blutplättchen 309. 372.

Blutprotease (siehe Proteasen).

Blutsverwandtschaftsreaktionen 336. 337.

Blutzucker 423. 424. 428.

Bodenbakterien 463.

Bromelin 275.

Butter als Substrat der Lipasebestim-
mung 482. 483.

Buttersäureäthyl- und Mandelsäureester
20. 474. 475. 490. 494—498. 500. 502.
504.

Carubinase (siehe Seminase).

Cellase (siehe Cellobiase).

Cellobiase 31. 34. 75. 76.

Cellobiose 37—39. 76. 134. 509. 510.

Cellobioseanhydrid (siehe Cellosan).

Cellobioseformel 509.

Cellosan 509. 510.

Cellosanbildung aus Cellobiose 509. 510.

— — Maltose 510.

Cellosanformel 509.

Cellules à boules 417—419.

— vacuolaires 417. 418.

Cellulose 76. 132. 252. 507. 509. 510. 525.

Cephalopoden (siehe Mollusken).

Chamberlandkerzen (siehe Tonkerzen).

Chemotaxis 397. 399. 400.

Chlorophyll 499. 500.

Chlorophyllase 499.

Chlorophyllkörner 419. 513.

Chloroplasten (siehe Chlorophyllkörner
und Chlorophyll).

Chlorphenylessigsäure 498.

Cholerakultur (siehe Choleravibrionen).

Choleravibrionen 341. 343—346. 363. 432.
465.

— Identifizierung durch Agglutination
343. 344.

— Identifizierung durch Bakteriolyse
(nach Pfeiffer) 344. 345.

— Identifizierung durch Bakteriolyse
(nach Plattenverfahren) 345. 346.

— Identifizierung durch Komplement-
bindung (nach Bordet) 363.

Cholesterin 368. 467. 497. 498.

Cholesterinase 497. 498.

Cholesterinesterspaltung 497. 498.

Cholesterinhemmung der Kobragift-
hämolyse 368.

Cholin 483. 484. 486.

Cholsauren 461. 462. 464. 475.

Chylurie 302.

Chylusfett 490.

Chymosin, Chymasen (siehe Lab).

Coccen 430. 432. 437. 462. 465.

Colibazillen 342. 432.

Cytokoagulasen 133.
Cytosin 447. 448. 454.

Danyszeffekt 325.

Darmschleimhautlipase 501.

Degeneration, fettige 244. 398. 399.

Dekapoden (siehe Krustazeen).

Denaturierungstemperaturen (siehe Koagulationstemperaturen).

Depolymerisation von Formaldehyd (siehe Depolymerisationsprozesse).

— des Inulins 521.

— der Stärke (siehe Depolymerisationsprozesse).

Depolymerisationsprozesse 425. 513. 516. 517. 521—525. 528—530. 533. 534. 537.

Desaggregationsprozesse 425. 511. 521. 523. 527. 530. 533.

Desamidierung von freien Purinbasen 442—445. 450. 451.

— von gebundenen Purinbasen 445—448. 450. 451.

Desassoziationsprozesse 510. 511. 523. 530.

Desassoziations- und Desaggregations- einfluß auf die Jodreaktion (siehe Dispersitätsgradenfluß auf die Jodreaktion).

Dextrinase 80—82. 128. 129.

Dextrine 80—83. 85. 93. 95. 97. 103. 105. 106. 108. 110. 113. 120—127. 129. 507. — kristallisierte 127. 512. 530. 531.

Dextrinisierung (siehe Dextrine).

Diabète bronze 378.

Diabetes 378. 379. 422. 470. 489.

Diagnostikum von Ficker 335. 341.

Dialyse 194. 220. 231. 261. 266. 267. 292. 298. 318. 320. 350. 368. 371. 374. 377. 380. 382—391. 403. 439. 481.

Dialysierbarkeit 318. 350. 383.

Dialysierhülsen 220. 383—386. 388. 389. — Eichung derselben 383—386.

Dialysiermembranen 383.

Dialysiervorrichtungen zur Eliminierung der Verdauungsprodukte 194. 220. 382. 403.

Dialysiermethode von van Calcar 403.

Dialysierverfahren von Abderhalden 368. 371. 374. 377. 380. 382—391.

— Fehlerquellen desselben 383—389.

Diaminosäuren (siehe Aminosäuren).

Diamylose 507—510. 512—516. 518 bis 520. 522—525. 530—533.

Diamyloseformel (siehe Diamylosekonstitution).

Diamylosekonstitution 507. 508. 514. 515.

Diamylosepolymerisation (siehe Polymerisation der Diamylose).

Diamylosestereoisomere 508.

Diastase 3. 5. 6. 11. 12. 15. 17. 21. 30—32. 60. 61. 78—131. 164. 165. 180. 236. 248. 252. 273. 306. 307. 369. 416. 478—480. 497. 502. 506. 507. 512. 513. 518. 519. 521—525. 527—530. 534. 536.

Diastasebeeinflussung durch Galle 89.

— durch Lezithin 89.

— durch pathologische Zustände 113 bis 117.

— durch Säuren, Basen und Salze 86 bis 91. 105. 502. 527.

— durch Strahlungen 94.

— durch das Substrat 497.

— durch Wechselströme 95.

Diastasedarstellung 79.

Diastaseermittlung 83. 95—113. 236. 507.

— durch Aenderung der Jod-Stärke- reaktion 102—106. Nach Dunstan und Dimmock 102, Jokichi Takamine 103, Moriarta 103, Sahli 105, Wohlgemuth 103—105.

— durch Glykogenspaltung 106. 107.

— durch Stärkeverflüssigung 100—102. 115.

— durch Zuckerbestimmung 96—100.

102. Nach Kubel 99, Lintner 96. 97, Sherman, Kendall und Clark 97, Wohlgemuth 98, Wroblewski 97. 98.

— mittels physik.-chem. Verfahren 107 bis 113, durch Aenderung des Adsorptionsvermögens der Stärke 113, durch Aenderung der Oberflächenspannung 113, durch Aufhellung von Starkelösungen 107, durch Bestimmung der Dispersitätszunahme 110. 121, durch Bestimmung der Volumabnahme 111, durch Dialyse 108. 109, durch Gerinnungserscheinungen 113, durch Kapillarisation 113, durch optische Methoden 112. 113. 122, durch osmotische Methoden 108—110, durch Viskositätsabnahme 101. 110. 111, durch Zunahme der Filtrationsfähigkeit 108, durch Zunahme der Gefrierpunktserniedrigung 110.

Diastasegesetze 83. 84.

Diastasemodelleigenschaften des Formaldehyds 7. 11. 12. 85. 113. 119—123. 139. 522. 524—529.

Diastasereaktionen 5—7. 12. 15. 31. 79 bis 87. 89. 95—113. 119—121. 136 bis 140. 236. 273. 478. 480. 518. 519. 521 bis 524. 528—530.

Diastase-Stärkebindung 530.

Diastasetheorie 118—129. 506. 527. 529. 530. 534.

Diastasevorkommen 81. 82.

Diastatischer Abbau (siehe Diastase).

Diastase-Zuckerbindung 536.

Diazetin 495.

- Diazetonglukose 534.
 Diazoaminverbindungen zur Identifizierung des Purinbasen 458.
 Diffusion 257. 298. 356. 412. 416.
 Diffusion von Antitoxinen 356.
 — von Fermenten 257. 298.
 Diformalinglukose 534.
 Diglukosan 523.
 Diglyzylglyzin 168.
 Diphtherietoxin und -antitoxin 427.
 Disaccharasen 31. 35—76.
 Disaccharatidentifizierung 35—39.
 Disaccharide 35—39. 507—510. 512. 513. 518. 519. 522. 524. 528. 531. 533—536 (siehe auch Kohlenhydrate).
 Dispersitätsgrad 511. 512. 521—523. 527. 528.
 Dispersitätsgradeinfluß auf die Jodreaktion 511. 512. 521—523. 527. 528. 531.
 — auf den Farbumschlag des Kongo-rubin 512.
 Drüsenzellen 417. 420. 421.
 Duodenalausheberung 479.
 Dysenteriebazillen 343. 430—433.
 Echinokokkendidiagnose 364. 367.
 Echtheitsprüfung von Bienenhonig 45. 46. 339. 340.
 — von Bienenhonig durch die Invertasermittlung 45. 46.
 — von Bienenhonig durch die Präzipitmethode 339. 340.
 Edestin 163. 205. 206. 333. 334.
 Eigelb als Substrat der Lipasebestimmung 476.
 Eingeweidewürmerhemmungstoffe (siehe Askaridenextrakthemmung).
 Eisenchloridreaktion der Salizylsäure 494.
 Eiweiß, artfremdes 278. 279. 305. 310 bis 312. 334. 348—350. 354. 356. 357. 372—374. 376. 377. 380. 395.
 — blutfremdes 366—375. 377. 379 bis 381. 396. 400.
 — des Bienenmagens 339.
 — des Blutserums 337. 392. 397—399.
 — von Typhusbazillen (siehe Bazilleneiweiß).
 Eiweißabbau in Sekretblasen 403. 412.
 Eiweißbestimmung bei Futtermittelanalysen 252. 253.
 Eiweißdifferenzierung 336—340. 354. 365. 366.
 Eiweißpaarlinge 448.
 Eiweißresistenz (siehe Resistenz von lebendem Eiweiß).
 Eiweißröhrchenherstellung für die Methode von Mett nach Christiansen 183. 197.
 Eiweißspaltung (siehe Proteasen).
 Eiweißsynthese, artgleiche 22. 23. 161. 162.
 — im tierischen Organismus 21—23. 160—162. 240 (siehe auch Synthese von Reserveeiweiß, Schutzschichten, Zellproteiden und Resynthese von Eiweiß).
 — in Pflanzen 150.
 Eiweißverdauung, parenterale 22. 30. 278. 279. 311. 312. 348. 350. 353—358. 362 bis 377. 379—381. 395. 396. 400.
 Eklampsie 357. 358.
 Elastin 165. 167. 171.
 Elaterase 146.
 Elektrolytwirkungen (siehe Ionenwirkungen).
 Emulsin 17. 18. 20. 31. 33. 34. 37—41. 66. 76—78. 141—155. 213. 306.
 — Anwendung zur Identifizierung, Konstitutions- und Konfigurationsbestimmung von Glykosiden und Polysacchariden 147—149.
 Emulsinermittlung 149—155.
 Emulsinhemmung durch Spaltprodukte 152. 153.
 — durch Zucker 152.
 Endoenzyme 134. 237. 276. 376. 397. 399. 402. 404—408. 411—415. 417. 419. 420. 425. 432. 451.
 Endoparasiten 430. 433.
 Endoproteasen (siehe Endoenzyme).
 Endotoxinbakterien 353. 354.
 Endotoxine 353. 354. 359. 361. 432.
 Endotryptase (siehe Endoenzyme und Phytoproteasen).
 Enteiweißen 45. 67. 98. 174. 236.
 Enterokinase 231. 261. 304—306. 308. 309.
 Enterokinasehemmung der Trypsinwirkung 305.
 Entgiftung durch Esterasen 498. 499.
 Enzyme (siehe Fermente).
 Eosinophile (siehe Leukozyten).
 Erepsin 161. 163. 168—172. 191. 204. 218. 223—237. 251. 252. 259. 260. 274. 352. 380. 395. 434. 449.
 Erepsinermittlung durch chemische Methoden 234—237.
 — durch Phosphorwolframsäurefällung 236. 237.
 — durch polarimetrische Untersuchung 225. 226.
 Ereptasen (siehe Erepsin).
 Ersatzzellen 375. 376. 400. 414. 417. 418. 427.
 Erythropräzipitine 338.
 Erythrozyte 146. 279. 323.
 Erythrozyten 360. 363. 364. 448. 452. 462. 464. 467. 468. 471. 489. 490.
 Erythrozytenlösung (siehe Hämolyse).

- Erythrozytenproteasen 323.
 Essigäther (siehe Aethylazetatverseifung).
 Esterasebeeinflussung durch Fluornatrium 497.
 — durch optische Antipoden 498.
 — durch das Substrat 497.
 Esterasegesetze 499. 501. 503—505.
 Esterasen 31. 450. 452. 458—505 (siehe auch Lipasen).
 Esterasewirkung auf giftige Ester 498. 499.
 Esterbeeinflussung durch Säuren, Basen und Salze 502. 503.
 — durch Substitution 498.
 Esterbildung (siehe Esterifizierung).
 Esterifizierung 460. 461. 486. 487. 500—506.
 Esterspaltung 460—462. 474. 475. 486 bis 504.
 Esterspaltung, asymmetrische 498. 502. 503.
 Euglobulinfraktion (siehe Globuline).
 Exkretive Funktion der Leberzellen von Wirbellosen 413. 417.
 Fehlingsche Lösung (siehe Fehling, Autorenregister).
 Fermentablenkung 316. 317. 320.
 Fermentative Aktivierungen (siehe Aktivierungen, fermentative).
 — Inaktivierungen (siehe Inaktivierungen, fermentative).
 — Spaltungen 10—14. 16. 28. 30—537.
 — Mechanismus derselben 10—14. 118. 119. 122. 528—530. 536. 537.
 — Uebersicht 31.
 — Synthesen 500—506. (siehe auch Reversibilität).
 Fermentbeeinflussung 25. 46—50. 79. 95. 138. 139. 151. 152. 185. 186. 188. 189. 242. 246—249. 256. 257. 260. 262. 266—272. 497. 503.
 — durch Antiseptika 242.
 — kolloidchemische, durch Alkohol 48 bis 50.
 — kolloidchemische, durch Ionen 247 bis 249. 256. 257. 260. 262. 268—272. 503.
 — kolloidchemische, durch Säuren, Basen und Salze 25. 46—49. 79. 138. 139. 247. 248. 503.
 — kolloidchemische, durch Schütteln 95. 307.
 — kolloidchemische, durch Temperaturänderung 46—48. 151. 152.
 — kolloidchemische, durch ultraviolette Strahlen 48. 152.
 Fermentbegriffe 3. 111.
 Fermentbeziehungen zu anderen Fermenten 255—261.
 — zu anorganischen Katalysatoren 4. 5. 7.
 Fermentbeziehungen zu Eiweißkörpern 3. 41.
 — zu Kohlenhydraten 41.
 — zu Kolloiden 7. 57. 112. 160 (siehe auch Fermentbeeinflussung, kolloidchemische).
 — zu Magnesium 41.
 — zu Toxinen 25—30.
 Fermentdiagnostikum 234.
 Fermentgesetze 6. 7. 47—51. 55—58. 61 bis 63. 66. 67. 83—85. 96. 154. 155. 161. 177. 180. 186—193. 195. 209 bis 214. 221—223. 228—230. 233. 258. 263. 273. 283—287. 310. 311. 472. 473. 477. 490. 496. 499. 501. 503—505.
 Fermentgifte 7 (siehe auch Paralytoren).
 Fermentgranula 409. 412.
 Fermenthydrolysen (siehe fermentative Spaltungen).
 Fermentmilch 474. 481.
 Fermentmodelle 7. 9. 11—14. 85. 113. 119—123. 139. 522. 524—529.
 Fermentoide (siehe Zymoide).
 Fermentschädigung durch Alkali 246. 247. 255. 268. 269. 287.
 — durch Antiseptika 242. 270.
 — durch Elektrizität 262.
 — durch Salze 271. 497.
 — durch Temperaturerhöhung 264. 265. 282. 285—287. 497.
 — in großen Verdünnungen 285.
 Fermentzellen 417. 419.
 Fettabbau in Sekretblasen 412.
 Fettgranula 402. 405. 406.
 Fettgranulaschwarzung durch Osmiumsaure 402. 403.
 Fethydrolyse 458—497. 500—503.
 Fettige Degeneration (siehe Degeneration, fettige).
 Fettsäurehemmung der Fettspaltung durch Lipase 404. 462. 463. 490. 491. 496. 500. 501.
 Fettsäuren 404. 462. 463. 465. 475 bis 477. 479. 484. 485. 487. 488. 490. 491. 495. 496. 500—503.
 Fettspaltung 401. 402. 404. 419. 420. 458—497. 500—503.
 Fettsynthese (siehe Synthese von Fett).
 Fibrin 164. 165. 167. 168. 170. 172. 176 bis 181. 205. 207. 221. 230. 237. 246. 249. 276. 290—296. 305. 307. 310. 320. 326. 330. 332. 333.
 Fibrinferment (siehe auch Gerinnungsfemente) 24. 290—312. 316. 317. 334.
 Fibrinfermentadsorption 292.
 Fibrinfermentbestimmung 302.
 Fibrinfermentreinigung 292.
 Fibrinogen 290—296. 299—304. 309 bis 312. 399.

- Fibrinogenermittlung 302.
 Fibrinogenspaltung 293. 294. 304. 312.
 Fibrinolyse 241. 251. 295. 307.
 Fluoridhemmung der Blutgerinnung 300.
 310. 497.
 — der Esterasen 497.
 Fluoridnachweis im Blutplasma 497.
 — in Nahrungsmitteln 497.
 Fluoridplasma 300.
 Forensischer Blutnachweis (siehe Blutnachweis, forensischer).
 Formaldehyd 9. 11. 12. 85. 92. 93. 110.
 113. 119—123. 139. 185. 186. 219. 220.
 506. 522. 524—537.
 Formaldehydhemmung von Zuckerreaktionen 536.
 Formaldehydhydrat 11. 122. 529. 532.
 Formaldehydmaltosebindung (siehe Formaldehyd-Zuckerbindung).
 Formaldehydperoxyd 9. 536.
 Formaldehydperoxydaserwirkungen 119.
 123. 536.
 Formaldehydpolymerisation (siehe Polymerisation des Formaldehyds).
 Formaldehyd-Stärkebindung 530. 531.
 533.
 Formaldehydwirkung auf Glykogen 524.
 — auf Stärke 11. 12. 85. 92. 93. 110. 113.
 119—123. 139. 506. 522. 524—537.
 — Hemmung durch Säure 527.
 Formaldehyd-Zuckerbindung 186. 534.
 535.
 Formhydroxamsäure 150.
 Formoltitrierung nach Sørensen 185. 219.
 220.
 Formose 525.
 Fruktosid (siehe Glykoside).
 Fruktosidasen (siehe Glykosidasen).
 Funktionsprüfung der Pankreasdrüse durch Lipasebestimmung 477—479.
 — der Pankreasdrüse durch die übrigen Fermentwirkungen 479.
 — der Pankreasdrüse durch die Kernprobe 449. 478.
 Galaktane (siehe Hemizellulosen).
 Galaktosid (siehe Glykoside).
 Galaktosidasen (siehe Glykosidasen).
 Gallensäureaktivierung von Amylsalicylase und anderen Esterasen 494. 496.
 Gallensäureaktivierung von Lipasen 461.
 462. 464. 475. 494. 495. 496.
 Gallensäurehemmung von Lipasen 495.
 Gamariden (siehe Krustazeen).
 Gastrolipase (siehe Magenlipase).
 Gastropoden (siehe Mollusken).
 Garprobe 72. 73. 159.
 Gärung 14—17. 61. 72. 73. 85. 134.
 — alkoholische 15. 17. 61. 72. 73. 85. 468.
 536.
 Gärung der Zellulose 134.
 Gärungsreger 5. 14. 15. 134 (siehe auch Saccharomyces).
 Gelase 135.
 Gelatine 165. 166. 189. 190. 201. 202. 237.
 246. 249. 276. 311.
 Gelatinekoagulation (siehe Koagulation von Gelatine).
 Gelose 135.
 Gentianase 77.
 Gentianose 33. 77.
 Gentiobiase (siehe Gentianase).
 Gentiobiose 33. 37. 38. 39. 75. 77. 78. 148.
 Gerinnungsfermente 24. 31. 274—312.
 316. 317. 319. 320. 321. 328—331. 334 bis 340.
 Gerinnungshemmende Substanzen 24.
 257. 258. 264. 266. 268—272. 291. 294.
 295. 296. 299. 300. 301. 302. 307. 309 bis 312. 316. 317. 319. 320. 321. 329.
 331. 332. 338. 341.
 Gerinnungszeit 284. 286. 287. 303. 304.
 — Bestimmung 303.
 Geschlechtsspezifität der Abwehrfermente 382.
 Gleichgewicht 16. 18. 19. 23. 64. 65. 85.
 93. 137. 152. 153. 160—162. 179. 180.
 183—186. 192. 193. 195. 231. 316. 318.
 321. 325. 358. 405. 410. 416. 423—427.
 435. 496. 497. 503. 513. 519. 523. 532.
 — dynamisches 118. 425.
 — falsches 16. 65. 74. 85. 152. 184. 185.
 192. 195. 229. 231. 416.
 Gleichgewichtsstörung 513. 532 (siehe auch Gleichgewichtsverschiebung).
 Gleichgewichtsverschiebung 503. 532.
 Gliadin 195.
 Globin 448.
 Globuline 290. 293. 294. 295. 315. 317.
 331. 344. 350. 363. 399. 416.
 Glukosamin 381.
 Glukosan 523.
 Glukosid (siehe Glykoside).
 Glukosidasen (siehe Glykosidasen).
 Glutininase 189. 227.
 Glutoidkapseln 478.
 Glykocholsäure (siehe Cholsäuren).
 Glykogen 94. 100. 106. 107. 120. 138. 419.
 420. 421. 423. 424. 428. 507. 510. 511.
 512. 521. 524.
 Glykogenkonstitution 507. 510. 511. 512.
 Glykogenspaltung (siehe Glykogen).
 Glykokoll (siehe Glycerin).
 Glykolyse (siehe Glykolytische Wirkung).
 Glykolytische Wirkung 421. 535. 536.
 Glykolytisches Enzym 421.
 Glykonasturtin 156. 157.
 Glykosidasen 31—34. 37—41. 66. 75—78.
 140—159.
 — Vorkommen 140. 141.

- Glykosidbindung (siehe Glykoside).
 Glykoside 32—34. 36. 38. 39. 40. 76. 140
 bis 159. 445. 446. 447. 450.
 Glykosidsynthese 153.
 Glycerinesterspaltung und Synthese (siehe
 Fett- und Esterspaltung, wie auch Fett-
 synthese sowie Esterifizierung).
 Glycerinphosphorsäure 484. 486. 498. 509.
 522.
 Glycerophosphatase 485. 486.
 Glyzin 435.
 Glyzylglyzin 161. 168. 170. 229.
 Glyzyl-l-tryptophan 171. 172. 173. 234.
 380.
 Glyzyl-l-tyrosin-anhydrid 161.
 Glyzyl-l-tyrosin-Spaltung 17. 169. 171.
 172. 173. 224—227. 232. 234.
 Grahamsches Gesetz 466.
 Granula des Bakteriophagen 433.
 Granulaform von Bazillen 431. 434.
 Graviden Serum 373. 382. 387.
 Gravidität 325. 357. 358. 373. 382. 387.
 389. 393. 395. 396. 400.
 Graviditätsreaktionen 325. 357. 358. 373.
 382. 389. 393. 395.
 Grenzhäuten 402. 403. 412.
 Gruber-Vidalsche Typhusreaktion (siehe
 Typhusreaktion von Gruber-Vidal).
 Gruppenreaktion (siehe Verwandtschafts-
 reaktion bei Bakterien).
 Grütznersche Methode (siehe Pepsin-
 ermittlung nach der Karmin-Fibrin-
 methode).
 Guanase 442. 443. 445. 450. 451.
 Guanaseermittlung 445.
 Guanideide 440.
 Guanidin 439.
 Guanin 442. 443. 445. 446. 447. 450. 451.
 454.
 Guaninermittlung 445.
 Guanosin 446. 450.
 Guanylsäure 446. 451.
 Gummiferment 132.
 Hadromal 133.
 Hadromase 133.
 Haptogenmembranen 412.
 Hardysche Regel 341.
 Harnferment (siehe Urease).
 Harngärung, ammoniakalische 435. 436.
 Harnsäure 444. 445.
 Harnsäureermittlung 444. 445.
 Harnstoffbildung aus Arginin 438. 439.
 — aus Kreatin und Kreatinin 439. 440.
 Harnstoffnachweis 436. 437.
 Harnstoffumwandlung in kohlensaures
 Ammon 436—438.
 Hauptzellen 260.
 Hämagglutinine (siehe Agglutination).
 Hämatin 448.
 Hämatoxylinfärbung von Eiweißein-
 schlüssen 407. 408. 409.
 Hamoglobin 338. 448. 465.
 Hämolyse 279. 350. 352. 362—368. 388.
 464. 465. 471. 472. 489. 490.
 Hamolysine 26. 464. 465. 467.
 Hämolytische Agentien als Lipaseaktiva-
 toren 462. 463. 464.
 Hämolytisches Serum 363—366. 388.
 Hefen und Hefeenzyme 33. 36—40. 42
 bis 45. 47. 52. 60. 61. 63. 64. 65. 69.
 70. 72. 75. 76. 81. 94. 134. 147. 148.
 315. 332. 351.
 Hefefett 468.
 Hefeinvertase (siehe Hefen und Hefe-
 enzyme).
 Heliziden (siehe Mollusken).
 Hemizellulasen 133. 134.
 Hemizellulosen 133. 134.
 Heterolyse 244. 245.
 — von tierischen Organen 244. 245.
 — von Tumoren 244.
 Hexamylasen 507. 510. 512. 513. 518.
 519. 522. 529. 530.
 α -Hexamylose (siehe Hexamylasen).
 β -Hexamylose (siehe Hexamylasen).
 Hexamyloseverbrennungswärme 510.
 Hippursäure 435.
 Hirudin 225. 301. 309.
 Hirudinplasma 301.
 Histidin 416.
 Histone 170. 448.
 Histozyt 435.
 Honiginvertase (siehe Invertase).
 Honiguntersuchung (siehe Echtheits-
 prüfung von Bienenhonig).
 Hormone 378. 379. 422. 470.
 Horneweiß (siehe Hemizellulosen).
 Hunger 404—406. 410. 415. 416. 491.
 — Wirkung auf Organfett 491.
 — Wirkung auf die Sekretbildung 405.
 406. 410.
 Hühnereiweiß (siehe Albumine).
 Hydatidenflüssigkeit 364.
 Hydratation 110. 118. 119. 122. 124. 527.
 Hydrogenasen 7.
 Hydrogenasereaktionen 7.
 — des Formaldehyds 7.
 Hydrolasen 445. 449. 450—504 (siehe
 ferner Hydrolyse).
 Hydrolyse 392. 393. 425. 434—446. 449
 bis 504. 506. 507. 509. 510. 513. 516.
 517. 519—524. 527—533.
 — von einfachen Estern 493—497. 500
 bis 504.
 — von Fetten 458—497. 500—503.
 — von Organeiweiß 392. 393.
 Hydrolytische Prozesse (siehe Hydro-
 lyse).
 Hydrophilie 108.

- Hydroxylionenhemmung der Milchgerinnung 255. 268. 269. 287.
 — der Parakaseinbildung 268.
 — der Parakaseingerinnung 268. 269.
 Hydroxylionenoptimum bei Lipasewirkungen 495.
 Hydroxylionenwirkung auf die Desaggregation der Stärke 511.
 — auf die Quellungsfähigkeit der Stärke 527.
 Hyperglykämie 421.
 Hyperlipämie 470.
 Hyperosmose bei der Bakteriophagenwirkung 433.
 — bei Sekretionsvorgängen 397. 398. 400. 403. 404. 406. 408. 410—414. 419. 420.
 Hypersekretion (siehe Sekretion).
 Hyposekretion (siehe Sekretion).
 Hypoxanthin 442. 444. 446. 447. 450.
 Hypoxanthinermittlung 444.
 Imidouracil (siehe Cytosin).
 Immunisierung 29. 72. 135. 152. 153. 231. 307. 317—320. 322. 331. 353. 354. 357. 358. 376. 426—430. 432. 469.
 Immunität 356. 369. 370. 371. 391. 432. 433. 434. 465.
 Immunitätsreaktionen 278. 279. 334 bis 377. 495.
 Immunkörper 30. 31. 54. 72. 132. 135. 152. 153. 231. 259. 264. 278. 279. 304. 305. 307. 308. 311. 317—320. 331. 334 bis 348. 350. 353. 355. 357. 358. 359. 362—367. 369. 371. 372. 373. 376. 377. 381. 466. 471.
 Immunsorum 29. 264. 308. 319. 320. 335. 336. 342—346. 363. 366. 376. 465.
 Inaktivierungen, fermentative 24. 46. 47. 48. 50. 51. 54. 59. 64. 65. 70. 74. 75. 81. 86—95. 105. 135. 137. 138. 139. 151 bis 153. 159. 161. 172. 183—186. 192. 193. 195. 222. 229—232. 246—249. 255. 257. 258. 261. 264. 266. 268—272. 282. 288. 291. 296. 299. 300. 305—309. 314—328. 352. 353. 358. 365. 368. 370. 373. 388. 396. 397. 415. 424. 426. 427. 434. 437. 451. 462. 463. 469. 470. 471. 490. 491. 492. 495. 496. 497. 502. 503.
 Inaktivierungstemperatur (siehe Tötungstemperatur und Temperaturempfindlichkeit von Fermenten).
 Index, opsonischer (s. opsonischer Index).
 Indikatoren 436. 437. 438. 479. 481. 482. 485. 487.
 Indimulsin 146.
 l-Indolalanin (siehe Tryptophan).
 Induzierte Reaktionen (siehe Reaktionen, induzierte).
 Inosin 450.
 Inosinhydrolase 450.
 Inosinsäure 446. 447.
 Inosit 499.
 Insektenlarven 413. 414.
 Insulin 422.
 Interferometrische Methode zur Abwehrfermentbestimmung 372. 393. 394. 395.
 Intrazelluläre Fermente (siehe Endoenzyme).
 — Synthese und Deponierung von Reservematerial 401. 404—408. 410. 411. 414. 415. 417. 419. 420. 421.
 — Verdauung 398. 399. 404. 406—415. 419. 420. 421.
 Inulin 134. 135. 507. 520. 521.
 Inulinase 134. 135. 507. 521.
 — Vorkommen 134. 135.
 Inulindepolymerisate 521.
 Inulindextrine 521.
 Inulinkonstitution 507. 520. 521.
 Inulinspaltung, fermentative 521.
 — pyrogene 521.
 Inversion (siehe Invertase).
 Inversionsgeschwindigkeit (siehe Invertasetheorie und Reaktionsgeschwindigkeit).
 Invertase 21. 31. 34. 40—61. 75—78. 84. 136. 137. 147. 154. 165. 369. 416.
 Invertaseanwendung zur Rohrzuckerbestimmung 43. 44.
 Invertasedarstellung 42.
 Invertaseermittlung 44—54. 59.
 — in Bakterien 51. 52.
 — in Bier und Wein 51.
 — in Honig 45. 46.
 — in Pflanzenteilen 52.
 — in tierischen und pflanzlichen Flüssigkeiten 51.
 — kapillaranalytische 236. 237.
 Invertasehemmung durch Hexosen 45.
 Invertasetheorie 54—60. 62.
 Invertaseschädigung durch Alkohol 51.
 — durch Elektrolyte 46—51.
 — durch Farbstoffe 48. 50.
 — durch Formaldehyd 50.
 — durch Galle 50.
 — durch Hexosen 45. 77.
 — durch Licht 48.
 — durch Rohrzucker 50.
 — durch Sauerstoff 48.
 — durch Temperatur 46. 47.
 Invertasevorkommen 52—54. 61.
 Invertinsäure 48. 49.
 Invertzucker 43. 45. 46. 57.
 Ionenwirkungen auf die Arsentrisulfidfällung 512.
 — auf die Blutgerinnung 296—299.
 — auf die Milchgerinnung 256. 257. 260. 262. 268—272. 284.

- Ionenwirkungen auf Stärke und Stärkespaltgemische 511. 512.
 Isoelektrisches Gerinnsel 256. 272. 341.
 Isolaktose 19. 40. 70.
 Isomaltose 37. 38. 39. 63. 64. 120. 125. 126. 137.
 Isopoden (siehe Krustazeen).
 Jatrochemiker 1. 2. 3.
 Jekorin (siehe Lipode).
 Jodamylopektinreaktion 511.
 Jodamylosenreaktion 508. 511. 531.
 Jodreaktionsänderung mit Änderung des Dispersitätsgrades 511. 512. 521. 522. 523. 531. 537.
 Joddextrinreaktion 103. 115. 120. 121. 123. 127. 236.
 Jodglykogenreaktion 106. 107. 120.
 Jodstärkereaktion 102—106. 111. 115. 120. 121. 123. 126. 127. 137. 175. 508. 511. 530. 531.
 Jodometrische Salzsäurebestimmung 220. 221.
 Kachexie 323. 469.
 Kachexiereaktion 323.
 Kalkzellen 417. 418. 419.
 Kalziumionenwirkung auf die Milchkoagulation (siehe Kalziumsalzwirkung).
 Kalziumsalzwirkung auf die Blutgerinnung 290. 291. 296—303. 310.
 — auf die Milchgerinnung 256. 257. 260. 262. 268—272. 275. 280—284. 286. 287.
 — auf die Pankreaslipasewirkung 481.
 — auf die Plasteinausflockung 329.
 Kapillaranalyse 113. 119. 136—139. 512.
 Kapillarisation 113. 136—139. 512.
 Kapillaranalytische Methoden zur Identitätsprüfung von Enzymen 136—138.
 Karbohydrasen (siehe Polysaccharasen).
 Karmin-Fibrinmethode (siehe Pepsinermittlung).
 Kasease (siehe Lab).
 Kasein 170. 189. 190. 198. 200. 203. 204. 216. 221. 222. 228. 229. 230. 237. 249. 256—265. 269. 274. 276. 277. 283. 284. 286. 288. 289. 292. 293. 294. 296. 311. 312. 327. 328. 330. 397. 399.
 Kaseinbestimmung 289. 290. 337.
 Kaseingerinnung (siehe Koagulation von Eiweißlösungen).
 Kaseinspaltung (siehe Lab).
 Käseerifung 258.
 Katalase 5. 6. 7. 24.
 Katalysatoren (siehe Katalyse).
 Katalyse 5. 6. 363. 503. 518. 519.
 Katalysedefinition 5. 6.
 Kinasen 231. 279. 292. 297. 298. 300—309. 316 (siehe auch Enterokinase u. Thrombokinase).
 Kinasen in Bakterien 308.
 — in Giftpilzen 309.
 — in Schlangengiften 308.
 Kjeldahlmethode zur Arignasebestimmung 439.
 — zur Proteasebestimmung 200. 201. 218. 239. 243. 245. 258.
 Koagulasen 254—313 (siehe auch Gärungsfermente).
 Koagulationstemperatur von Fibrinoglobulin 293. 294. 295. 317.
 — von Fibrinogen 293. 294. 295.
 — von Heteroalbumosen 295.
 Koagulationstemperaturen 293—295. 317.
 Koagulation von Eiweiß 237. 239. 256 bis 260. 262. 264—272. 275. 277. 279 bis 284. 286. 287. 289. 292—296. 300 bis 305. 309—312. 316. 317. 320. 326 bis 343. 441. 444. 445. 486.
 — von Gelatine 185. 190. 201. 202.
 — von Glykogen 94.
 — von Milch (siehe Lab).
 — von Serum 326.
 — von Starkelösungen 93. 94. 110. 113. 138.
 Koaguline 310 (siehe auch Plasteine).
 Koagulosen 160.
 Kobragift (siehe Kobralysin).
 Kobralezithid 465.
 Kobralysin 299. 351. 358. 368. 465.
 Kochsalzhemmung d. Pepsinverdauung 186. 223.
 Kochsalzplasma 301.
 Koenzyme (siehe Kofermente).
 Kofermente 9. 24. 481.
 Kohlenhydrate 21. 186. 193. 223. 252. 253. 369. 372. 379. 397. 398. 404. 405. 415. 419—425. 445. 447. 451. 454. 457. 458. 506—537.
 Kohlenhydrathemmung der Pepsinverdauung 186. 193. 223.
 Kohlenhydratkonstitution 506—537.
 Kohlenhydratsynthese in Pflanzen (siehe Stärkesynthese, natürliche und Assimilation von Kohlensäure).
 — im tierischen Organismus 21.
 Kolloidchemische Beeinflussungen 266 bis 272. 296. 299. 304. 341. 367. 424. 425. 428. 429. 503. 511.
 — Fermentbeeinflussung (siehe Fermentbeeinflussung, kolloidchemische).
 — Substratbeeinflussung (siehe Substratbeeinflussung, kolloidchemische).
 Kolloide 466. 503. 507. 511. 521. 523. 530.
 Kolloideinfluß bei der Agglutination 341.
 — bei der Antikörperproduktion 424. 425. 428. 429.
 — bei der Wassermannschen Reaktion 367.

- Kolloidwirkungen auf die Blutgerinnung 299. 304.
 — auf die Milchgerinnung 272.
 Kolostralfett 399.
 Kolostrastadium 397. 400.
 Kolostrumkörperchen 399.
 Kolpoden 430.
 Komplement 279. 304—308. 310. 311. 312. 316. 317. 335. 336. 344. 345. 348. 350—353. 361—367. 373. 377. 465. 471. 472.
 Komplementablenkung (siehe Komplementbindung).
 Komplementbindung 279. 317. 335. 336. 350. 351. 362—367. 377. 465. 472.
 — Anwendung zur Echinokokkendignose 364.
 — Anwendung zur Eiweißdifferenzierung 365. 366.
 — Anwendung zur Karzinomdiagnose 364. 377.
 — Anwendung zur Typhusdiagnose 363.
 — Anwendung zur Untersuchung verdächtiger Bakterienstämme 363.
 Konglutinationsreaktion 336.
 Kongorubin 512.
 Konstitution höherer Kohlenhydrate 506 bis 521.
 Kreatase 439. 440. 441.
 Kreataseermittlung 440. 441.
 Kreatin 439—442.
 Kreatinermittlung 441.
 Kreatininhydrisierung (siehe Kreatininbildung).
 Kreatinase 439. 440. 441.
 Kreatinaseermittlung 440. 441.
 Kreatinin 440—442.
 Kreatininbildung aus Kreatin 440. 441. 442.
 Kreatininermittlung 441. 442.
 Krebsdiagnose 335. 336. 346—348. 373 bis 377. 382.
 — nach der Abderhaldenreaktion 373 bis 377. 382.
 — nach der Aufhellungs- und Auszählungsmethode einer Geschwulstzellenaufschwemmung 347.
 — nach der Komplementbindungsreaktion 364. 377.
 — nach der Meistagminreaktion 346 bis 348. 377.
 — nach der Präzipitinmethode 335. 336. 377.
 — nach der Ueberempfindlichkeitsreaktion 377.
 Kristallstiel 414. 415. 416.
 Krustazeen 401—406. 408. 411. 412. 417.
 Krustazeeneiweiß 371. 404. 405.
 Krustazeenfett 401—405.
 Lab 26. 31. 41. 66. 93. 160. 164. 254—290. 292—295. 297. 306. 307. 310. 311. 312. 319. 320. 329. 331—335. 489. 533.
 — Anwendung zur Substratbestimmung 289. 290.
 — Bestimmung 258. 279—283.
 — Historisches 254. 255.
 — Vorkommen 254. 255. 260. 274—278.
 Labführende Pflanzen (siehe Phytochymasen).
 Labgesetze 263. 273. 283—287. 310.
 Labstandardlösung 331. 332.
 Labzymogen 260. 261. 279—282.
 Laccase 9. 16. 24.
 Laccasekoferment 9. 24.
 Laktase 19. 31. 32. 36. 40. 60. 69—75. 262.
 Laktasebildung 70. 71. 262.
 Laktasedarstellung 70.
 Laktaseermittlung 71—74.
 Laktasegesetze 74. 75.
 Laktasehemmung 69. 70. 72.
 Laktasevorkommen 69. 70.
 Laktobionsäure 70.
 Laktose 32. 36. 40. 47. 54. 63. 69—75. 262. 370. 371. 397. 401.
 Laktosespaltung (siehe Laktase).
 Lamellibranchier 414. 416.
 Langerhanssche Inseln 421. 422.
 Lävoglukosan 513. 516. 517. 519. 523.
 Lävulopolyase (siehe Raffinase).
 Lebenskrafthypothese 2. 4.
 Leberlipase 464. 497. 499. 500. 504.
 Lebersaftwirkung auf Morphinglykolsäureester 499.
 Leberschläuche 401. 403. 405. 411. 412. 420.
 — der Krustazeen 401. 403. 405.
 Leitfähigkeitsmethode zur Trypsinbestimmung (siehe Trypsinermittlung).
 Leprabazillen 350. 386. 392. 465.
 Leuchtbakterien 36. 72.
 Leukämie 323.
 Leukoproteasen (siehe Leukozytenproteasen).
 Leukothrombin (siehe Thrombozym).
 Leukozytärer Fermentursprung 290. 304. 307. 309. 310. 311. 316. 322. 372. 373.
 Leukozyten (siehe auch Phagozytose) 241. 242. 249. 278. 290. 304. 305. 307. 312. 322. 323. 350. 359—361. 372. 397 bis 400. 431. 433. 452. 462. 470.
 Leukozytenbeeinflussung durch Thorium 372.
 Leukozytenkerne 290.
 Leukozytenproteasen 162. 204. 242. 249. 307. 309—311. 315. 322. 325. 372.
 Leukozytenzerstörung, kritische 322.
 Leukozytose 323. 368.
 Leuzin 416. 417.
 Leuzinesterspaltung, asymmetrische 498.

- d-l-Leuzyl-glyzin 232.
 Leuzylleuzin 170.
 Lezithin 461. 464. 465. 482. 485. 498.
 — als Substrat zur Lipasebestimmung 483—486.
 Lezithinaktivierung der Hämolyse 464.
 — der Lipasen 464.
 Lezithinase 483—485.
 Lezithin- und sonstiger Lipoideinfluß auf die Blutgerinnung 299.
 — auf Tryptasen 317.
 Lezithinspaltung, asymmetrische 498.
 Lichtschädigung von Fermenten 48. 152.
 — von Fermenten durch Sensibilisierung 48.
 Lieberkühnsche Drüsen 232. 375.
 Lipaseadsorption an Ester 504.
 Lipaseaktivatoren 460—463. 484. 494. 495. 496. 502. 503.
 Lipasebindung an Ester 504. 505.
 Lipaseermittlung 475—493. 498.
 Lipaseermittlung durch Trioleinsynthese mittels Organpulver 505. 506.
 — mittels Aethylbutyrat, Amylsalizylat usw. 493—496.
 — mittels Butter 482.
 — mittels Eigelb 476. 477. 486.
 — mittels Lezithin 483—486.
 — mittels Mandelölemulsion 475.
 — mittels Milchlipp 476.
 — mittels Monobutyryl (siehe Monobutyrylase).
 — mittels Rizinusöl 475. 476.
 — mittels Tributyrin 491. 492.
 — nach Ehrmann 477.
 — nach Grützner 475.
 — nach Kanitz 475. 476.
 — nach Rona und Michaelis 487. 488. 491. 492.
 — nach Saxl 482. 483.
 — nach Volhard-Stade 476. 477. 486.
 — zur Funktionsprüfung der Pankreasdrüse 477—479.
 — zur Wirkungswertprüfung von Pankreaspräparaten 479—482.
 Lipasegesetze (siehe Esterasegesetze).
 Lipasen 20. 21. 24. 31. 248. 350. 351. 353. 364. 369—372. 394. 399. 402. 458—505.
 Lipasepräparate 479—482. 493. 494. 497 bis 506.
 Lipasepräparateherstellung 480—482. 493. 494. 505.
 Lipaseschädigung durch Fluornatrium 497.
 — durch Öle 502.
 — durch Säuren 502.
 Lipasewirkung auf giftige Ester 498. 499.
 Lipasezymogen 461. 462. 474. 479. 481.
 Lipode 299. 356. 359. 360. 365. 368. 386. 392. 461. 463. 464. 465. 467. 468. 482 bis 485. 497. 498.
 Lipolyse (siehe Fettspaltung).
 Lösliche Stärke (siehe Stärke, lösliche).
 Löwe-Zeißches Flüssigkeitsinterferometer (siehe interferometrische Methode).
 Lymphozyten (siehe Leukozyten).
 Lysine 299. 351. 355—359. 362—373. 376. 416. 424. 431—434. 464—467. 471. 472.
 Lytischer Immunkörper (siehe Immunkörper).
 Lytische Stoffe (siehe Lysine).
 Magenlipase 458. 459. 465. 472. 475. 477. 484. 489. 491. 492. 493.
 Magenlipaseaziditätsoptimum 492.
 Magenlipaseermittlung mittels Tributyrin 492.
 Magenlipaseunterscheidung von Pankreaslipase mittels Tributyrin 492. 493.
 Magnesiumsulfatplasma 301. 302.
 Magnesiumsulfatwirkung bei Tetanus 466.
 Malaria plasmodien 383.
 Maltase 19. 31. 32. 34. 60—68. 72. 73. 75. 148. 519. 524.
 Maltaseermittlung 66—68.
 Maltasegesetze 62. 63.
 Maltasehemmung durch Zucker 63. 65.
 Maltasevorkommen 61.
 Maltose 17. 19. 32. 37. 38. 39. 60. 61. 63 bis 68. 85. 95. 96. 98—100. 120. 125. 126. 137. 140. 141. 186. 420. 507—510. 512. 513. 518. 519. 522. 524. 528. 531. 533—536.
 Maltoseanhydrid 507—513. 515. 519. 522. 534.
 Maltoseformel 508.
 Maltosespaltung (siehe Maltase).
 Mandelölsplaltung 475.
 Mandelsäureesterspaltung, asymmetrische 498.
 Mangansalzaktivierung bei Blutlipasen 461. 463.
 — bei Pankreaslipasen 463.
 — bei Phytolipasen 463.
 — bei Schlangengiftlipasen 463.
 Maninotriose 78.
 Mannane (siehe Hemizellulosen).
 Mannogalaktan (siehe Hemizellulosen).
 Massenwirkungsgesetz 9. 16. 18. 19. 23. 24. 28. 57. 64. 69. 140. 153. 229. 240. 315. 396. 397. 400. 401. 404. 405. 406. 415. 423—428. 463. 502. 503. 505. 531.
 Meiotagminreaktion 113. 279. 346—348. 377. 391.
 Melezitase 77.
 Melezitose 77.
 Melibiase 31. 34. 75. 141.
 Melibiose 33. 40. 75. 76. 77.
 Membrandiffusion (siehe Dialyse).

- Menschenblutnachweis (siehe Eiweißdifferenzierung und Blutnachweis, forensischer).
 Metakaseinreaktion 262.
 Metathrombin 291. 297.
 Metazym (siehe Metathrombin).
 Methylglykoside 32. 61. 149. 157.
 Methylisorhamnosid 34. 149.
 Methylostärke 510.
 Methylostärkemolekulargewicht 510.
 Mettsche Methode 165. 268. 333. 415. 416 (siehe auch Pepsinbestimmung nach Mett).
 Milchdrüse 396—400.
 Milcheiweiß 337. 397—401 (siehe auch Kasein).
 MilCHFett 399. 400. 476.
 Milchpulver zum Labnachweis 280. 283.
 Milchsäurehemmung der Nukleinsäurespaltung 451.
 MilChzucker (siehe Laktose).
 Milchzuckerhefen 36. 37. 39. 40. 69. 72. 76.
 Milzbrandbazillen 466.
 Mitteldarm 401. 413. 420.
 Mitteldarmdivertikel 401. 403. 404. 407. 409. 411. 412. 420.
 Mitteldarmdrüse 401. 407. 408. 416. 419.
 Molekülassoziation (siehe Assoziation).
 Molkenalbumose 256. 259. 294. 317.
 Molkenproteine 337.
 Mollusken 416—420.
 Monazetin 495. 496.
 Mongolismus 378. 379.
 Monobutyryn 460. 461. 486—492. 496. 501. 502.
 — als Substrat der Lipasebestimmung 486. 487. 492.
 Monobutyrynase 460. 486—491.
 Monobutyrynsynthese, fermentative 501. 502.
 Monomolekulare Reaktionen 47. 55. 56. 58. 62. 65. 84. 154. 190. 195. 229. 496. 500. 501. 521.
 Moore-Hellersche Reaktion 99. 100. 525.
 Morphinglykolsäureesterspaltung durch Lebersaft 499.
 Multirotation 44. 50. 55. 56. 60. 62. 64. 65. 112. 154.
 Muscheln (siehe Lamellibranchier).
 Muskulaturveränderungen, regressive, beim Froschlarvenschwanz 398.
 — bei der Insektenmetamorphose 398.
 — beim Uterus 398. 399. 400.
 Muzinase 254.
 Myoklasten 399.
 Myronsaures Kalium (siehe Sinigrin).
 Myrosin 155—157. 399.
 Myrosinermittlung 157.
 Myrosinvorkommen 155. 157.
 Myrosinase (siehe Myrosin).
 Nahrungsmittelprüfung auf Natriumfluorid 497.
 Nahrungsmittelverfälschung 337—340.
 — Nachweis durch die Präzipitinmethode 337—340 (siehe auch Eiweißdifferenzierung).
 Narkotikawirkung auf die Oberflächenspannung 360.
 Nastin 350.
 Nebenniere 249. 377. 378. 379.
 Ninhydrinreaktion 218. 220. 325. 371. 372. 381. 385—390. 394. 395.
 Normallab 258.
 Nukleasen 31. 248—456.
 Nukleasenermittlung durch Verflüssigung 453—456.
 — polarimetrische 453. 455. 456.
 Nukleasenpräparatherstellung 453.
 Nukleinasen 449. 451. 452. 456.
 Nukleinsäure 128. 290. 397. 399. 446 bis 449. 451—457.
 Nukleinsäureverflüssigung 453—455.
 Nuklealbumine 259.
 Nukleoproteide 298. 299. 448. 449. 451.
 Nukleosidamidasen 445. 450. 451.
 Nukleosidasen 450. 451. 452. 456. 457.
 Nukleosidasenermittlung 457. 458.
 Nukleoside 446. 447. 449—452. 456.
 Nukleotidasen 450. 451. 452. 456. 457.
 Nukleotidasenermittlung 456. 457.
 Nukleotide 446. 449. 451. 452. 456.
 Oberflächenspannung 346. 360. 391. 487.
 — bei Serumbazillengemischen (siehe Meistagminreaktion).
 Oberflächenspannungsveränderung beim Eiweißabbau 391.
 — bei Einzelligen 360.
 — bei Leukozyten 360.
 Oelsäure 483. 484. 485. 500. 501. 505. 506.
 Oktamylose 507. 510.
 Oktamyloseverbrennungswärme 510.
 Olein 458. 469. 473. 483. 485. 501. 502. 506.
 Olivenölspaltung 475. 497. 501.
 Opsonierung (siehe Opsoninreaktion).
 Opsoninreaktion 278. 350. 358—362. 433.
 — Anwendung zum Bakteriophagenlysinnachweis 433.
 — Anwendung zur Tuberkulosediagnose. 360. 361.
 — Ausführung 360. 361.
 Opsonischer Index 360. 361. 433.
 Organautolysate (siehe Autolysate von Organen).
 Organesterasen 496. 497. 499. 500. 503 bis 506.
 Organlipasen 460. 496. 497. 499. 500. 503. bis 506.
 Organfettmobilisierung 491.

- Organpreßsaft 435. 439. 441. 505.
 Organpreßsaftwirkung auf Pankreaslipase 481.
 Organpulver 395. 439. 443. 486. 505. 506.
 Organspezifität 380. 381. 396.
 — der Abwehrfermente 380. 381.
 Organzubereitung für das Dialysierverfahren von Abderhalden 386. 387.
 — für das interferometrische Verfahren von Abderhalden-Hirsch 394. 395.
 — für das polarimetrische Verfahren von Abderhalden 392. 393.
 Ornithin 438. 439.
 Osazone 12. 32. 35—37. 39. 60. 67. 68. 70. 71. 77. 78. 158.
 Oxalatplasma 300. 301.
 β -Oxyakrylsäureureid 447.
 Oxydasen 5. 8—11. 24. 536.
 Oxydationsfermente (siehe Oxydasen).
 Oxytrilase 142. 153.

 Palmitin 458. 478. 479. 483.
 Palmitinsäure 500.
 Pankreas 377. 378. 379. 421. 422. 449. 451—453. 458—461. 463. 465. 471. 472. 475. 477—482. 484. 488. 489. 492 bis 495. 503. 505. 523.
 Pankreasdiastase 523 (siehe auch Pankreas).
 Pankreasfunktionsprüfung 449. 477—480.
 Pankreaslipase 458—461. 463. 465. 471. 472. 475. 477—481. 484. 492—495. 503. 505.
 Pankreaslipaseaziditätsoptimum 492.
 Pankreaslipaseunterscheidung von Magenslipase mittels Tributyrin 492. 493.
 Pankreatin (siehe Trypsin, Pankreaslipase und Pankreasdiastase).
 Papayotin 13. 160. 233. 237. 238. 275. 278.
 Papayotinermittlung 237. 238.
 Papain (siehe Papayotin).
 Parachymosin 263. 285. 286. 287. 320 (siehe auch Chymasen).
 Parakasein 256. 260. 265. 267. 268. 269. 271. 272. 276. 282. 283. 284. 288. 291. 293. 294. 320.
 Parakaseinkalk 256.
 Parakaseinspaltung 258. 259. 260. 265. 267. 268. 276. 282.
 Paralysatoren (siehe Inaktivierungen, fermentative).
 Paralsyierung, fermentative 266. 288. (siehe auch Inaktivierungen, fermentative).
 Paratyphusbazillen 342. 343. 432.
 Paratyphuskultur (siehe Paratyphusbazillen).
 Parathyreoidea 422.
 Parenterale Eiweißverdauung (siehe Eiweißverdauung, parenterale).

 Pektase 135.
 Pektinase 135. 136.
 Pektinstoffe 135. 254.
 Pektorinase 135.
 Pentosen 445. 446. 450. 457.
 Pentoside (siehe Glykoside).
 Pepsin 6. 13. 14. 15. 26. 30. 31. 41. 83. 100. 151. 161. 163—169. 171. 172. 175 bis 189. 191—193. 195—201. 203—216. 218—223. 227—229. 233. 235. 237. 252. 253. 255. 256. 258—263. 265. 266. 267. 269. 273. 274. 279. 287—289. 297. 298. 306. 307. 319. 321. 325. 332. 333. 334. 340. 346. 390. 391. 395. 415. 416. 449. 451. 467. 472. 473. 489. 502.
 Pepsinasen (siehe Pepsin).
 Pepsinbestimmung durch physikalisch-chemische Methoden 207—218.
 — durch Ermittlung der elektrischen Leitfähigkeit 209. 210.
 — durch Ermittlung des Gefrierpunkts 210.
 — durch Ermittlung der interferometrischen Veränderungen nach Hirsch 216 bis 218.
 — durch Ermittlung der optischen Veränderungen 210—218.
 — durch Ermittlung des osmotischen Drucks 210.
 — durch Ermittlung der Polarisierung nach Schutz 210—214.
 — durch Ermittlung der refraktometrischen Veränderungen nach Obermayer, Pick und Scherer 215. 216.
 — durch Ermittlung der Rotation 215. 216.
 — durch spektrophotometrische Bestimmung der Verdauungsprodukte nach Klug 214.
 — durch Ermittlung des spezifischen Gewichts 210.
 — durch Ermittlung der Viskositätsänderungen 207. 208.
 — durch Ermittlung der Volumänderungen 208.
 — mittels der Biuretreaktion 167.
 — mittels Edestin nach der Methode von Fuld 187. 205. 206. 333. 334.
 — mittels Eiereiweiß 164. 165. 172. 176. 177. 179—193. 195—201. 206. 210 bis 215. 333. 415.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von Allen 201.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von Bettmann und Schroder 199. 200. 206.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von Bidder und Schmidt 199.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von Cromer 200.

- Pepsinbestimmung mittels Eiereiweiß nach der Methode von Hammerschlag 199.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von Hata 206.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von Korn 199.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von Krüger 198.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von Liebmann 206.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von Mett 165. 176. 177. 182—193. 195 bis 197. 333. 415.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von Obermayer und Pick 215.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von O'Sullivan, Oppenheimer u. Aron 200.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von Schorer 215.
 — mittels Eiereiweiß nach der Methode von Schütz 210—214.
 — mittels Erbsenglobulin 206.
 — mittels Gelatine 165. 166. 184. 185. 196. 201.
 — mittels Gelatine nach der Methode von Arrhenius 201.
 — mittels Karminfibrin nach d. Methode von Grützner 164. 165. 172. 176. 177. 179. 180. 193. 205. 207. 221. 332. 333.
 — mittels Kasein 192. 193. 198. 200. 203. 204. 216. 221—223.
 — mittels Kasein nach der Methode von Groß 203.
 — mittels Kasein nach der Methode von Grutzner 204.
 — mittels Kasein nach der Methode von Hedin-Sjöqvist 200.
 — mittels Kasein nach der Methode von Robertson 216.
 — mittels Kasein nach der Methode von Thomas und Weber 198.
 — mittels Kasein nach der Methode von Volhard 192. 193. 221—223.
 — mittels Rizin 166. 206. 214. 334.
 — mittels Serumplatten nach Müller-Jochmann 166. 176. 197.
 — nach Grünhagen 176. 178—180. 193.
 — nach Spriggs 207. 208.
 Pepsinhemmung durch die Verdauungsprodukte (siehe Inaktivierungen, fermentative, Gleichgewicht, Reversibilität, Spaltprodukthemmung).
 Pepsinkation 188.
 Pepsinogen 187. 189. 205—207. 209. 210. 260. 261.
 Pepsinregeneration 207.
 Pepsinwirkung auf Trypsin 352.
 Pepsinsekretion 194. 195.
 Pepsinstandardlösungen 197. 333.
 Peptasen (siehe Erepsin).
 Peptidabbau (siehe Erepsin).
 Peptonabbau durch Abwehrfermente 392. 393.
 Peptonbildung durch Zellfermente 407 bis 412.
 Peptondarstellung für die Abwehrfermentbestimmung 392. 393.
 Peptone (siehe Polypeptide).
 Peptonisation (siehe Peptonbildung).
 Peptonschock 349. 367 (siehe auch Anaphylaxie).
 Peritrophische Membran 414. 415.
 Peroxydasereaktionen 7. 9. 119. 136. 388. 536.
 — des Benzaldehyds 9.
 — des Formaldehyds 7. 9. 119. 536.
 — Hemmung derselben durch Zucker 536.
 Peroxyde 5—9. 119. 124. 247. 312. 514. 536.
 Pferdefleischnachweis 338. 339.
 — durch die Präzipitinmethode 338. 339 (siehe auch Eiweißdifferenzierung und Nahrungsmittelverfälschung).
 Pflanzeneiweiß 336. 354. 371.
 Pflanzenproteasen (siehe Phytoproteasen)
 Phagozyten 278.
 Phagozytose 162. 350. 359. 361. 398. 399. 419.
 Philanuslarven 500.
 Phosphatationwirkung, kolloidchemische 511.
 Phosphatpuffer und Phosphorsäure 486. 488. 491—493.
 Phosphorwirkung auf Amylose 511.
 Phosphorwolframsäurefällung zur Ermittlung der Autolyse 243.
 — zur Ermittlung von Erepsin 236. 237.
 — zur Ermittlung von Phytoproteasen 239.
 Phytase 499.
 Phytin 499.
 Phytinspaltung 499.
 Phytochymaseimmunserum 264.
 Phytochymasen 254. 255. 264. 274—278. 320.
 Phytol 500.
 Phytolipasen 462. 463. 468. 469. 471. 473. 474. 475. 480. 481. 484. 501. 502. 503.
 — Darstellung 480. 481.
 Phytoproteasen 227. 237. 238. 239. 328. 329.
 Phytoproteasenermittlung 237—239.
 Phytotryptasen (siehe Phytoproteasen).
 Pikraminsäure 441.
 Pikrinsäure 441. 444.
 Pikrinsaurereduktion durch Kreatinin 441.

- Plasteine 160. 161. 183. 257. 315. 328 bis 331. 434.
 Plasteinferment (siehe Plasteine).
 Plasteinogene Wirkung (siehe Plasteine und Resynthese von Eiweiß).
 Plasteinreaktion (siehe Plasteine).
 Plazenta-eiweiß 325. 357. 358. 373. 374. 386. 387. 389. 393. 395. 396. 397. 400.
 Pockenlymphe 430.
 Polarimetrie bei der Stärkespaltung 519. 522. 524. 525.
 Polarimetrische Änderungen (siehe Polarimetrie).
 Polarimetrische Methode zur Abwehrfermentbestimmung 372. 391—393.
 — zur Ermittlung der Nukleinsäurespaltung 455. 456.
 Polyamylosen 510. 511. 530. 532 (siehe auch Di-, Tetra-, Hexa- und Oktamylose).
 Polyamylosenmolekulargewicht 510. 511.
 Polyamylosenverbrennungswärme 510.
 Polymerer Formaldehyd (siehe Polymerisation des Formaldehyds).
 Polymerisation der Anhydrotrifruktose zu Inulin 520.
 — des Cellosans zu Cellulose 510.
 — von CH-OH zu Diamylose 514. 515. 516. 518. 519. 520.
 — von CH-OH zu Triamylose 514—519.
 — der Diamylose zu Glykogen 510. 511.
 — zu Polyamylosen 507. 510. 512. 513. 517.
 — zu Stärke 507. 508. 510. 511. 513. 516. 520. 523.
 — des Formaldehyds 525—530. 533. 537.
 — der Triamylose 512. 518. 519. 520.
 Polymerisationsgrad 510. 511.
 Polymerisationsprozesse 507. 508. 510 bis 514. 517—520. 523. 525—529. 533. 537.
 Polypeptide 17. 161. 163. 168—175. 179. 185. 191. 192. 199. 201. 203. 210—212. 214. 218. 220. 221. 224—230. 232—236. 238. 239. 242—244. 249. 251. 256 bis 259. 273. 279. 288. 290. 294. 295. 301. 309. 317. 318. 321. 328. 330. 348—350. 353. 356—358. 367. 375. 380. 383. 385. 386. 390. 392. 393. 396. 407—411. 416. 420. 425. 434. 437. 474.
 Polypeptidspaltung (siehe Polypeptide).
 Polyphosphorsäuren 447. 449.
 Polysaccharasen (siehe auch Diastase) 31—140. 254. 506. 507.
 Polysaccharide (siehe Kohlenhydrate).
 Präzipitine (siehe Präzipitinreaktion).
 Präzipitinreaktion 259. 279. 330. 356. 363. 365—367. 377. 423.
 Präzipitinreaktion zur Echtheitsprüfung von Honig 339. 340.
 — zur Eiweißdifferenzierung höherer Tiere 336—339.
 — zur Erkennung der Blutsverwandtschaft 336.
 — zur forensischen Blutermittlung 337. 338.
 — zur Krebsdiagnose 335. 336. 377.
 — zur Pferdefleischermittlung 338. 339.
 — zur Typhusdiagnose 335.
 Probefrühstücke 476. 477. 478.
 — mit Eigelb 476.
 — mit Oel 477. 478.
 — mit Palmin 478.
 — mit Sahne 477.
 Proenzyme (siehe Zymogene).
 Protagon (siehe Lipide).
 Protamine 160. 170. 189. 233. 448.
 Protaminresynthese 160.
 Proteaseanwendung zur Substratbestimmung 251—254.
 Proteasebestimmung, quantitative 164. 175—245. 258.
 Proteasedifferenzierung 167—175.
 Proteasenachweis 164—167.
 Proteasen 31. 132. 159—269. 273—282. 287—289. 294—299. 304—335. 339 bis 342. 344—353. 355—359. 362—377. 380—383. 386. 388—400. 403—405. 407—416. 420. 427. 432—434. 448. 449. 469. 471. 472. 477—480. 495. 533.
 Proteine 252. 253. 293. 298. 392. 413.
 Proteolyse bei der Abderhaldenreaktion (siehe Abwehrfermente).
 — bei der Agglutination 340. 341.
 — bei der Anaphylaxie 356. 357. 358.
 — bei der Bakteriozidie 344—346. 350 bis 353. 355.
 — bei der Eliminierung der Antitoxine 356.
 — bei der Komplementbindung 362.
 — bei der Labwirkung und Blutgerinnung 258. 261. 262. 263. 265. 267. 273 bis 280. 288. 293—297. 304—312. 316. bis 321. 533.
 — und Aenderung der Oberflächenspannung 346. 347.
 — und Aenderung des optischen Verhaltens 346.
 — und Diffusionsbeschleunigung 346.
 — und Viskositätsverminderung 346.
 — endoenzymatische 412. 413 (siehe auch Peptonbildung).
 Proteolytische Fermente (siehe Proteasen).
 Prothrombase 296. 297. 299. 302. 304 bis 309. 312.
 Prothrombaseermittlung 302. 303.
 Prothrombin (siehe Prothrombase).

- Protrypsin (siehe Trypsinogen).
 Prunase (siehe Emulsin).
 Prunasin (siehe Amygdalose).
 Pseudoglobulinfraktion (siehe Globuline).
 Pseudolab 320.
 Psychosereaktion von Geißler 367. 373.
 Psychosenserum 367. 368.
 Ptyalin (siehe Diastase).
 Puffergemische 488. 491—493.
 Purinamidasen 248. 442—448. 450. 451. 452.
 Purinbasen 242. 243. 442—447. 450 bis 454. 456—458.
 Purinbasenermittlung 444. 445. 457. 458.
 Pyrimidinkomponenten der Nukleinsäure 447. 448.
 Pyrimidinnukleotide (siehe Nukleotide).
 Pyrogene Stärkespaltung (siehe Stärkespaltung, pyrogene).

 Quellbarkeit der Stärke 511.
 Quellung von Bakterienmembranen 340.
 — von Eiweiß durch Pepsinwirkung 340.
 — von Lipasen 503.
 — und Hydratisierung 527.
 — und Spaltung 527.
 Quellungshemmung durch Säuren 527.
 Quellungstemperatur 108.
 Quellungsvolumen 108.

 Raffinase 76. 77. 78.
 Raffinaseermittlung 77.
 Raffinose 33. 54. 76. 77. 141. 147. 148.
 Reaktionen, induzierte 529. 530.
 Reaktionsbahn 410. 415. 421. 425. 426. 518.
 Reaktionseinfluß 321. 431. 451. 473. 474. 495. 496.
 Reaktionsgeschwindigkeit 55. 57. 62. 63. 65. 83—85. 103. 153—155. 184. 189. 190. 195. 209. 212. 213. 228. 229. 230. 232. 265. 266. 267. 284. 286. 311. 392. 463. 495. 504. 505. 532.
 Reaktionszeit (siehe Reaktionsgeschwindigkeit).
 Reaktivierung von hitzeinaktivierten Fermenten durch Blut-, Serum- und Gewebeextrakte 307. 311.
 — von inaktivem Fibrinferment durch Alkali 291. 297.
 Reduktasen 444 (siehe auch Hydrogenasen).
 Regurgitierter Duodenalininhalt 477. 478. 479. 492.
 — Pankreassaft (siehe regurgitierter Duodenalininhalt).
 Reservestoffe 396. 397. 400—408. 410 bis 415. 419—425. 428.
 Reservezellenbänder 402.
 Resistente Bakterienformen 431. 434.

 Resistenz von Geweben gegen die gewebs-eigenen Proteasen 313—315.
 — von lebendem Eiweiß 240. 247. 312. 313. 376. 434. 448.
 Resorption 401. 404—408. 410—415. 418 bis 421. 426.
 Resorptionszellen 418. 419.
 Resynthese von Eiweiß 160—162. 257. 315. 328—331.
 — von Estern 460. 461. 486. 487. 500 bis 506.
 — von Fetten (siehe Resynthese von Estern).
 — von Glykosiden 153.
 — von Polysacchariden 93. 507. 508. 510. 512. 513. 517—520. 522. 523. 524.
 — von Protamin 160.
 Retrogradation von Stärke 93.
 Reversibilität 18—23. 28. 29. 58. 63. 64. 93. 118. 137. 140. 152. 153. 160—162. 179. 180. 183. 184. 185. 192. 193. 195. 257. 315. 325. 358. 396. 397. 400—406. 408. 410—417. 419—421. 423—427. 435. 460. 461. 469. 489. 496. 500. 506. 512. 518. 519. 522. 523. 524. 531. 532.
 Reversible Reaktionen (siehe Reversibilität).
 Reversion (siehe auch Reversibilität).
 — kolloidchemische 512. 523. 531. 532.
 Reversionsdextrine 12. 19. 123. 522. 523.
 Revertase 137.
 Revertose 63.
 Rhamninorhamnase 77. 146.
 Rhamninorhamnose 77.
 Ribose 445. 446. 450. 457.
 Riboselaktin 446.
 Rizin 166. 206. 324. 334.
 Rizinsäure 481.
 Rizinuslipase (siehe Phytolipasen).
 Rizinusölspaltung 474. 475. 481. 502.
 Rohrzucker (siehe Saccharose).
 Rohrzuckerspaltung (siehe Invertase).
 Rohrzuckersynthese 58.
 Ruhrbazillen (siehe Dysenteriebazillen).

 Saccharifizierende Fermente (siehe auch Polysaccharasen).
 — — Zusammenfassung 158. 159.
 Saccharomyces apiculatus 36. 52. 60.
 — ellipsoideus 81.
 — exiguus 60. 61.
 — Kefir 76.
 — Logos 81.
 — Ludwigii 60. 61.
 — Marxianus 60.
 — pastorianus 81.
 — Pombe 81.
 Saccharomyzetenantipepsin (siehe Hefenzyme).

- Saccharose 40—47. 50—55. 57. 58. 76. 77.
 136. 137. 147. 149. 188. 369. 371.
 Saccharosebestimmung 43. 44.
 Saccharosespaltung (siehe Saccharose und
 Invertase).
 Salizinspaltung (siehe Emulsin).
 Salizylsaure 493. 494.
 Salizylsäureamylester (siehe Amylsali-
 zylat).
 Salizylsäureeisenchloridreaktion 494.
 Salizylsäuremethylester 494.
 Salizylsäureschmelzpunkt 494.
 Salmin und Sturin (siehe Protamine).
 Salolspaltung 493.
 Salzeinfluß auf die Agglutination 340.
 — auf die Milchgerinnung (siehe Ionen-
 wirkungen auf die Milchgerinnung).
 — auf Lipasewirkungen 463. 496. 497.
 Salzsäurebestimmung, jodometrische (s.
 jodometrische Salzsäurebestimmung).
 Salzsäurewirkung auf Pepsin (siehe Pep-
 sin) und Aktivierung von Pepsinspal-
 tungen durch H⁺-ionen.
 — auf Trypsin 478.
 Sarkoklasten (siehe Myoklasten).
 Sarkosin 440.
 Sauerstoffabspaltung bei der Kohlensäure-
 assimilation 514.
 Sauerstoffhemmung der Autolyse 247.
 Sauerstoffhemmung der Blutgerinnung
 312.
 Säureaktivierung bei der fermentativen
 Esterbildung 502.
 — der Phytolipasen 474. 475. 481.
 — der Pankreaslipase 482. 484.
 Säurehemmung bei der Diastasewirkung
 auf Stärke 527.
 — bei der Fettsynthese 502.
 — bei der Formaldehydwirkung auf
 Stärke 527.
 — bei der Komplementbindung 365.
 — der Quellungsfähigkeit der Stärke 527.
 Schilddrüse (siehe Thyreoidea).
 Schilddrüsenexstirpation und Blutlipasen
 464. 470.
 — und Leberlipasen 464.
 Schilddrüsenhypersekretion und Blut-
 lipasen 470.
 Schlangengifte (siehe Kobralysin).
 Schizosaccharomyces octosporus 52. 61.
 76. 81. 148.
 Schock, anaphylaktischer 369. 370.
 Schutzkolloide bei der Milchgerinnung 272.
 Schüttelinaktivierung 95. 307.
 Schüttsches Gesetz 83. 177. 186—193.
 195. 211—214. 221—223. 228. 230. 233.
 258. 273. 285. 472. 473. 477. 490. 499.
 Seidenfibroin 173.
 Seidenpepton 225. 226.
 Seitenkettentheorie 26. 27.
 Sekretbeeinflussung durch die Nahrung
 232.
 Sekretbildung (siehe Sekretion und Se-
 krete).
 Sekretblasen 401. 403. 406. 412. 413. 414.
 419.
 Sekrete 231. 232. 400—406. 411—417.
 419—422. 427. 449. 478. 479. 494. 495.
 Sekretion 194. 195. 232. 241. 261. 282.
 370. 376. 378. 379. 396—429. 470.
 — innere 241. 378. 379. 421. 422. 470.
 Sekretionsdiastase 80.
 Sekretorischer Ersatz 429.
 Sekretive Tätigkeit (siehe Sekretion).
 Sekretzellen 402. 418. 419. 420.
 Selbstgärung 474. 481.
 Selbstregulierungen 23. 24. 25. 51. 53. 406.
 Selbstverdauung (siehe Autolyse).
 Seminase 132. 133.
 Senfölglykoside 155—158.
 — Vorkommen 156. 157.
 Sensibilisierung 353. 354. 355.
 Serumdiagnose maligner Tumoren (siehe
 Krebsdiagnose).
 Serumeiweiß (siehe Eiweiß des Blut-
 serums).
 Serum, hämolytisches (siehe hämolyti-
 sches Serum).
 Serumhemmung der Blutgerinnung 294.
 316.
 — der Kobragifthämolyse 368.
 — der labenden Wirkung 269. 319. 320.
 — der Milchgerinnung (siehe Serum-
 hemmung der labenden Wirkung).
 — der proteolytischen Eiweißverdauung
 318. 321. 331—334.
 — der Trypsinwirkung (siehe Antitryp-
 sin).
 Serumreaktionen der Gravidität (siehe
 Graviditätsreaktionen).
 Serumwirkung auf Pankreaslipase 481.
 Simultanreaktionen 311. 425. 426. 510.
 532.
 Sinalbin 156.
 Sinigrin 156. 157.
 Sörensenmethode zur Plasteinunter-
 suchung 330. 331.
 Spaltprodukthemmung der Autolyse 415.
 — der Bakteriolyse 434.
 — der Blutgerinnung 370.
 — der Blutlipase 490. 491.
 — der Eiweißspaltung 396. 397. 400. 404.
 408. 410. 411. 415. 416. 426. 427. 434.
 462. 463. 490. 491.
 — der Fettspaltung 404. 462. 463. 490.
 491. 500. 501.
 — der Lipolyse (siehe Spaltprodukthem-
 mung der Fettspeicherung).
 — der Milchsekretion 397. 400.
 — der Plazenta-eiweißspaltung 358.

- Spaltprodukthemmung von Toxinwirkungen 426. 427.
 — der Ureasewirkungen 437.
 Spaltungen durch Fermente (siehe fermentative Spaltungen).
 Speichelhemmung der Labwirkung 271.
 Spezifität der Antikörper 425—428.
 Sphaeroma (siehe Krustazeen).
 Spinnenextraktwirkung (siehe Arachniden).
 Spirochäten 366.
 Spontanaktivierungen des Lipasezygens 474.
 Stachyase 78.
 Stachyose 33. 78.
 Stalagmometer 346. 348. 391. 484. 487. 488. 492. 493.
 Stärke 79—90. 92—108. 110—113. 119 bis 127. 129. 136—140. 236. 273. 370.
 — lösliche 97. 122. 123. 124. 126. 136. 137. 506. 507. 508. 510—513. 516 bis 530. 532. 533. 534. 536. 537.
 Stärkebeeinflussung, kolloidchemische, durch Ionen 511. 512.
 Stärke-Diastasebindung (siehe Diastase-Stärkebindung).
 Stärke-Formaldehydbindung (siehe Formaldehyd-Stärkebindung).
 Stärke-Formaldehydreaktion 86. 120. 506. 522. 524—534. 536. 537.
 Stärkeherstellung 124.
 Stärkekleisterröhrchen und Platten zur Diastasebestimmung 100. 101.
 Stärkekongstitution 507. 508. 510—519 528.
 Starkelösungen, Herstellung 97. 98. 103.
 Stärkemolekulargewicht 510.
 Stärkespaltung (siehe Diastase).
 Stärkespharite (siehe Stärkesphärokristalle).
 Stärkesphärokristalle 521. 523. 527. 530.
 Stärkespaltung, diastatische (siehe Diastase).
 — pyrogene 513. 516. 518.
 — durch Säuren 518—522.
 Stärkesynthese, natürliche 513—516.
 Stärkeverbrennungswärme 510.
 Stärkeverflüssigung durch Diastase 81. 83. 85. 94. 95. 100—102.
 — durch Formaldehyd 86. 120.
 Steapsin und Pankreatin (siehe Lipasepräparate).
 Stearin 458.
 Stearinsäure 500. 501.
 Stereoisomerie bei den Diamylosen 508.
 Substratbeeinflussung, 50. 86. 92. 184. 185. 202. 232. 247. 248. 249. 256.
 Substratbestimmung mittels Lab 289. 290.
 Sykochymase 278.
 Synaptase (siehe Emulsin).
 Synthese von Amidin 435. 440.
 — von Fett 401. 404. 419. 420. 425. 460. 461. 469.
 — von Kohlenhydraten 419—425.
 — von Kreatinin 440. 441.
 — von Reserveeiweiß 396. 397. 400. 401. 407. 408. 411. 413—416.
 — von Schutzschichten 434.
 — von Zellproteiden 427.
 Synthesebeschleunigung von Fermenten 405. 500—506.
 Synthesen, fermentative 500—506 (siehe auch Reversibilität).
 Syntonin 239.
 Takadiastase 62. 65. 84. 94. 103. 237. 276.
 Taurocholsäure (siehe Cholsäuren).
 Tautomerisation der CH—OH-Gruppe 514.
 Tegenaria (siehe Spinnen).
 Temperatureinfluß auf die Blutgerinnung 292.
 — auf die Labung 284—287.
 — auf die Verdaulichkeit des Milcheiweiß 269.
 Temperaturempfindlichkeit von Fermenten 47. 62. 68. 79. 80. 81. 94. 151. 152. 237. 278. 282. 285. 286. 287. 293. 305 bis 307. 311. 316. 317. 320. 350. 353. 373. 388. 437. 471. 497.
 Temperaturoptimum (siehe auch Temperaturempfindlichkeit von Fermenten).
 — von Phytoproteasen 278.
 — der Urease 437.
 Temperatursteigerung durch artfremdes Eiweiß (siehe Anaphylaxie und Eiweißdifferenzierung).
 Tenebriolarven 413.
 Tetanolyisin und Tetanospasmin (siehe Tetanustoxin).
 Tetanusserum 466.
 Tetanustoxin 466. 467. 468.
 Tetraglukosan 523.
 α-Tetramylosen (siehe Tetramylosen).
 Tetramylosen 507. 510. 512. 513. 522. 523. 524. 529. 530.
 Tetramyloseverbrennungswärme 510.
 Tetraphosphorsäure 447.
 Tetrasaccharasen 78.
 Thermolabilität (siehe Temperaturempfindlichkeit).
 Thermostabilität (siehe Temperaturempfindlichkeit).
 Thoriumwirkung auf Leukozytenzahl 372.
 Thrombidium (siehe Arachniden).
 Thrombin (Thrombase) (siehe Fibrin-ferment).
 Thrombogen (siehe Prothrombase).

- Thrombokinas 297. 299. 300—305. 307.
308. 309. 312.
— Darstellung 303.
Thromboplastin (siehe thromboplastische Substanz).
Thromboplastische Substanz 301. 303.
Thrombosin 290.
Thrombosinkalk 290.
Thrombozym 295. 304.
Thymin 448. 454.
 α -Thymonukleinsäure 453—455. 457.
Thymusdrüsen 448. 449.
Thyreidea 241. 324. 377—379. 422. 464. 470.
Tonkerzen 430. 431.
Tötungstemperatur von Fermenten 81.
94. 95. 151. 152. 311. 316. 373. 388. 437. 471.
Toxinbakterien 29. 319.
Toxine 25. 30. 319. 325. 351. 352. 353. 355. 356. 357. 427. 432. 434. 466. 467. 468.
Translokationsdiastase 80.
Trehalase 31. 34. 68. 69.
Trehalose 37. 38. 39. 68. 69.
Triamylase 512—516. 518. 519.
Triamylaseformel 515. 516. 517.
Triazetin 495. 501. 503.
Tributyryl 460. 491. 492. 501.
— als Substrat der Lipasebestimmung 491—493.
— zur Unterscheidung von Magenlipase und Pankreaslipase 492. 493.
Triglyzyl-glyzinester 224.
Trihexosan 513. 514. 516. 517.
Trihexosanformel (siehe Triamylaseformel).
Triketohydrindenhydrat siehe Ninhydrinreaktion).
Triolein (siehe Olein).
Trisaccharasen 76—78.
Trisaccharide 56—78. 512—521.
Trypsin 15. 30. 31. 151. 160—173. 175. 178. 180. 185. 189. 190. 191. 196. 198. 200—204. 206. 208—210. 213. 215. 218. 219. 223—235. 237. 252. 253. 255. 258 bis 262. 269. 279. 281. 282. 288. 289. 297. 298. 304—309. 312. 313. 316—320. 325—328. 347. 352. 395. 449. 451. 478. 479. 481. 533.
Trypsinanon 189.
Trypsinbestimmung durch physik.-chem. Methoden 207—218. 225. 226.
— durch Ermittlung der elektr. Leitfähigkeit 189. 190. 209. 210.
— durch Ermittlung des Gefrierpunkts 210.
— durch Ermittlung des polarimetrischen Verhaltens 225. 226.
— durch Ermittlung der Viskosität 207. 208.
Trypsinbestimmung durch Ermittlung der Volumänderungen 208.
— mittels Eiereiweiß 165. 209.
— mittels gefärbtem Fibrin 164. 165. 170. 178. 237. 326.
— mittels ungefärbtem Fibrin 180. 230.
— mittels Gelatine 165. 166. 189. 190. 201. 202. 237.
— mittels Kasein 171. 189. 190. 200. 203. 204. 230. 237. 327. 328.
— mittels Milch 166. 325.
— mittels Rizin 166. 206.
— mittels Serumplatten 176. 326.
Trypsinbestimmungen nach Fermi, Arrhenius und Palitzsch (siehe Trypsinermittlung mittels Gelatine).
Trypsinogen 171. 189. 231. 305. 306. 308. 309. 314. 481.
Trypsinstandardlösung 327.
Tryptasen (siehe Trypsin).
Tryptische Spaltung (siehe Trypsin).
Tryptophan 167. 172. 173. 234.
Tuberkelbazillen 341. 350. 351. 360. 361. 380. 386. 392. 431. 465. 466. 470.
Tuberkulinreaktion 354. 380.
Tumoraulyse 249.
Tumoreiweiß 347. 373—376.
Tumorenzyme 322. 364. 469.
Tumorgewebe (siehe Tumoreiweiß).
Tumorklösung 468—471.
Tumorklysin 347.
Tumorkproteasen und -peptasen 322. 364. 469.
Turanase 75.
Turanose 75. 77.
Typhusbazillen 335. 341. 342. 343. 346. 432.
Typhusbazilleneiweiß (siehe Bazilleneiweiß).
Typhusdiagnose 335. 341. 342. 343.
— nach der Fickerschen Präzipitinmethode 335.
— nach der Gruber-Vidalschen Agglutinationsprobe 341. 342. 343.
— nach der Komplementbindungs-methode 363. 364.
Typhuskultur (siehe Typhusbazillen).
Typhusreaktion von Ficker 335.
— von Gruber-Vidal 341—343.
— von Wassermann und Bruck 363. 364.
Tyrosin 174. 175. 403. 416. 417 (siehe auch Aminosäuren).
Tyrosinase 175.
Tyrosinnachweis 174. 175.
Ueberempfindlichkeitsreaktion (siehe Anaphylaxie).
Umkehrbarkeit (siehe Reversibilität).
Umlagerung der α -Amylosen in β -Amylosen 523.

Umlagerung der γ -Fruktose 520. 521.
 Uracil 447. 448.
 Urease 435—438.
 Ureasedarstellung aus *Micrococcus ureae* 437.
 — aus Schimmelpilzen 436. 437.
 Ureaseermittlung 436. 437.
 Ureide 440. 447.
Urobacillus Pasteuri 436.

Verbrennungswärme der Polyamylosen 510.
 — der Stärke (siehe Verbrennungswärme der Polyamylosen).
 Verdaulichkeitsprüfung bei Futtermitteln 252. 253.
 Verdauung (siehe fermentative Spaltungen).
 — intrazelluläre (siehe intrazelluläre Verdauung).
 Verdauungsgeschwindigkeit (siehe Reaktionsgeschwindigkeit).
 Veresterung (siehe Esterifizierung).
 Verkleisterung der Stärke 511.
 Verseifung 458.
 Verwandtschaftsreaktionen 342. 495.
 — bei Bakterien 342.
 Verzuckerung (siehe Diastase).
 Virulenz 345. 430. 431. 432.
 Virus 430. 432.
 Viskosimeter (siehe Viskosität).
 Viskosität 101. 110. 111. 207. 208. 391.
 Viskositätsbeeinflussung der Stärke durch Salze 101.
 Vitalfarbstoffe 417.
 Vitalistische Gärungstheorie 14. 15.
 Vitalitätsherabsetzung von Bakterien 359. 361.

Wachsspaltung durch *Philänuslarven* 500.
 Wassereinfluß auf Lipasewirkungen 502.
 Wassermannsche Reaktion 365—368. 373.
 Wasserstoffionenoptimum der Kaseinspaltung 266. 267.
 — der Lipasewirkungen 474. 503.
 — der Parakaseinausfällung 267.
 — der Rizinuslipase 474.
 Wasserstoffionenwirkung auf den Dispersitätsgrad von Stärkespaltgemischen 527. 531.
 — auf Fermentmoleküle 503.
 — auf die Milchgerinnung 267. 270. 272.
 — auf die Quellungsfähigkeit der Stärke 527.
 — auf die Stärkesphäritbildung 527.

Wasserüberträger 10. 11. 13. 14. 111. 118. 119. 532.
 — aldehydische 11. 13. 14. 119. 120. 122. 532.
 — fermentative 10. 11. 13. 14. 111. 118. 119.
 Weigertsches Gesetz 27.
 Wirkungswertprüfung von Pankreaspräparaten durch Lipasebestimmung (siehe Lipaseermittlung).
 Wittepepton (siehe Polypeptide).

Xanthin 442—445. 450.
 Xanthinermittlung 444. 445.
 Xanthinoxydase 444.
 Xanthosin 450.
 Xanthosinhydrolase 450.
 Xylanase 133.
 Xylane (siehe Hemizellulosen).

Zein 377.
 Zeitgesetz der Labung (siehe Labgesetze).
 — der Lipase 472. 473.
 — der Thrombase 310. 311.
 Zelleinschlüsse 404. 405. 407—414. 417. 419.
 Zellfermente 470.
 Zellobiose (siehe Cellobiose).
 Zellstoffwechsel 240.
 Zellstoffwechselschädigungen 240.
 Zellulase (siehe Zytase).
 Zellulose (siehe Cellulose).
 Zellulosespaltung (siehe Zytase).
 Zitratplasma 301.
 Zoogloebildung 434.
 Zucker-Diastasebindung 534. 536.
 Zuckerhemmung von Formaldehydreaktionen 536.
 Zucker-Formaldehydbindung 186. 534 bis 536.
 Zusammenfassung der analytischen Anwendungen der saccharifizierenden Fermente 158. 159.
 Zweienzymtheorie 81. 86. 94. 102. 127. 128. 129. 137. 451. 521. 524.
 Zweifermenttheorie (siehe Zweienzymtheorie).
 Zwischenreaktionskatalysen 8—11.
 Zymase 15. 17. 61. 148. 468. 536.
 Zymoexzitoren (siehe Kofermente).
 Zymogene 80. 94. 171. 187. 189. 205. 206. 207. 260. 261. 274. 279—282. 291. 296. 297. 299. 302. 304—309. 314. 333. 340. 461. 462. 474. 479. 481.
 Zymoide 306. 307.
 Zymolysin (siehe Enterokinase).
 Zytase 80. 131—134.
 — Vorkommen 133. 134.

Autorenregister.

- Abderhalden 17. 20—22. 25. 30. 54. 165.
 168. 171—174. 217. 220. 224. 225. 232.
 234. 242. 252. 291. 325. 346. 349. 351.
 357. 358. 369—374. 376—378. 381—386.
 388—395. 464. 469. 478. 491.
 — (siehe auch Emil Fischer und Abder-
 halden).
 — und Brahm 21. 169. 233.
 — Caemmerer und Pincussohn 229.
 — und Dammhahn 168.
 — und Deetjen 224. 386.
 — und Emmerling 277.
 — Freund und Pincussohn 391.
 — und Geddert 170.
 — und Gigon 161. 163. 224. 231.
 — und Heise 234.
 — und Hunter 224.
 — und Immisch 391.
 — und Israel 391.
 — und Kämpf 349.
 — und Kapfberger 21. 54.
 — und Koelker 168. 174. 224—227. 230.
 — Koelker und Medigreceanu 469.
 — und Kramm 259. 269.
 — und Lampé 21. 388. 466.
 — und Mc. Lester 224.
 — London und Vögtlin 168. 234.
 — und Lussana 224.
 — und Manwaring 224. 386.
 — und Medigreceanu 469.
 — und Michaelis 224. 229.
 — und Miki Kiutsi 391.
 — und Oppler 224.
 — und Pettibone 392.
 — und Pincussohn 391. 469.
 — Pincussohn und Walther 168. 469.
 — Pincussohn und Weichardt 224.
 — und Pringsheim 170.
 — und Rathsmann 54. 391.
 — und Reinbold 173.
 — und Rilliet 170.
 — und Rona 21. 168. 224. 465. 469.
 — Rona, Medigreceanu und Pincussohn
 172.
 — und Roux 21. 168. 224. 465. 469.
- Abderhalden und Schilling 391.
 — und Schittenhelm 168. 171. 174. 225.
 451. 454.
 — und Schmid 391.
 — und Schmidt, H. 385. 389.
 — und Sleswyk 391.
 — und Steinbeck 213. 224. 225.
 — und Strauch 167.
 — und Ternuchi 168. 224. 234. 275.
 — und Wildermuth 393.
 Abelous und Soula 367.
 Abramow 365.
 Achalmé 58. 313. 317.
 — und Bresson 58.
 — und Stévenin 325.
 Achard und Clerc 331. 469. 481. 489.
 Addison 377—379.
 Agulhon 270.
 Ahrens, H., 368.
 Akunew 328.
 Albrecht 275.
 v. Aldor 459.
 Alessandro 224.
 Allaria 116. 271.
 Allemann 267. 270.
 — und Müller, W. 257.
 Allen 201.
 Altmann 352.
 Amantea 171.
 Ambard und Binet 115.
 Amberg und Jones 443. 450. 455.
 — und Loevenhart 497.
 Angerer (siehe v. Bergmann und Angerer).
 Apsit und Gain 82.
 Araki 448.
 Argaud und Billard 310.
 Arinkin 246. 451.
 Armstrong 19. 45. 63—65. 74. 77. 141.
 150—152. 436. 475. 522.
 — und Glover 32. 77.
 — und Horton 69. 141. 142. 154. 155.
 436.
 — und Ormerod 473.
 Armstrong (siehe auch Emil Fischer und
 Armstrong).

- Aron (siehe Oppenheimer und Aron).
 — und Klempin 238.
 Aronowsky (siehe Pringsheim und Aronowsky).
 Aronsohn und Blumenthal 241.
 Arrhenius 10. 27. 188—190. 193. 195. 201. 212. 213. 228. 284. 285. 311. 473. 501.
 d'Arsonval 181.
 Arthus 3. 271. 290. 291. 300. 310. 490. 497.
 — und Hubert 173. 295.
 — und Paget 256. 290. 300.
 Ascoli 346.
 — und Bezzola 308. 322.
 — und Bonfanti 93. 114.
 — und Izar 248.
 — und Neppi 227.
 Aschner 377.
 Asher 458.
 — und Beyer 458.
 van Asperen 223.
 Astaschewsky 87.
 Atkinson 128.
 Aubry (siehe Kämmerer und Aubry).
 Auerbach 277.
 Auld 141. 142. 152. 154. 155.
 — (siehe auch Henry und Auld).
 Austrian (siehe Jones und Austrian).
 Autoren zu Autolyse 250. 251.
 — zu Glykoside 143—147.
 — zu Leukozytenfermente 250.
 — zum Vorkommen der Diastase 129 bis 131.
 Axenfeld 54.
 Aznar (siehe Weinberg und Aznar).
- Babcock und Russell 258.
 Babes und Jonesco, H. 377.
 Babkin 461.
 Bach 9.
 Baer und Loeb 315.
 Baginsky 274.
 Bail 432.
 Bail und Suzuki 362.
 Bainbridge 70.
 — und Beddard 117.
 Baker (siehe Ling und Baker).
 Bamberg 313.
 — (siehe auch v. Bergmann und Bamberg).
 Bang 12. 45. 91. 98. 117. 254. 259. 260. 263. 272. 285—287. 312. 331. 456. 526.
 Baranetzki 79. 80. 82. 96.
 Barendrecht 58.
 Barfoed 68. 518. 519.
 Barikine 359.
 Barker (siehe auch Opie, Barker und Dochez).
 Barlocco 249. 326.
 Barral (siehe Lépine und Barral).
- Barratt 364.
 Barth 42.
 Barthet und Bierry 77.
 de Bary 133. 277.
 Basedow 378. 379. 470.
 Bass 140.
 Batelli 303.
 — und Lina Stern 313.
 Bau 47. 51. 60. 75. 76.
 Baudisch 150.
 Bauer 317. 337. 469.
 Bauer und Reich 328.
 Bauereisen 337.
 Bayer 330.
 — G. (siehe Schryver und Bayer).
 Bayliss 63. 64. 153. 161. 189. 190. 208. 209. 213. 228. 320.
 — und Starling 230. 305. 308.
 Bayne-Jones 310.
 Beam (siehe Leffmann und Beam).
 Bearn und Cramer 306.
 Béchamps 48. 52. 53. 169.
 Beck (siehe Hirsch-Beck).
 Becker 263. 283. 325.
 — (siehe auch R. O. Herzog, Becker und Kasarnowski).
 Beckmann 532.
 Beddard (siehe Bainbridge und Beddard).
 Behne 382.
 Behrendt (siehe Braun und Behrendt).
 Behrens 135.
 Behring 355. 356.
 Beitzke und Neuberg 152. 153.
 Belazzi 246.
 Bellonci 404.
 Bence-Jones 373.
 v. Benczur 116.
 Bénech und Guyot 460. 472. 489.
 Benson und Wells 240.
 Benjamin 270.
 Bergell 462. 465.
 — (siehe auch Schütze und Bergell).
 — und Falk 224.
 — und Lewin 225.
 — und Liepmann 224.
 — und Schütze 173. 231.
 v. Bergmann 234. 317.
 — (siehe auch Fuld, Bergmann und K. Meyer).
 — und K. Meyer 321.
 v. Bergmann, G. 313.
 — — und Angerer 313.
 — — und Guleke 313.
 Berlese 407—409. 411.
 Bernabei 312.
 Bernard, Cl. (siehe Claude-Bernard).
 Berner 382.
 Bert, Paul 420.
 Bertarelli 469.
 Berthelot 42. 458.

- Bertrand 9. 45. 76. 135.
 — und Compton 76. 141. 151. 153.
 — und Holderer 76.
 — und Rosenblatt 60.
 Berzelius 4—6. 83. 116. 255.
 Berzeller 460. 463. 482.
 Bettencourt und Menczes 373.
 Bettmann und Schröder 199. 206.
 Beyerinck 36. 58. 61. 72. 80. 133.
 — (siehe auch Leube und Beyerinck).
 — und van Delden 135.
 Bezzola 258.
 — (siehe auch Ascoli und Bezzola).
 Bial 60.
 Bickel 459.
 Bidder und Schmidt 182. 199.
 Biedermann 413. 414. 458. 536.
 — und Moritz 134. 418.
 Biedl und Kraus 349.
 Bielfeld 83. 84.
 Bienenfeld 269.
 Bierich (siehe Morawitz und Bierich).
 Biernacki 80.
 Bierry 33. 53. 62. 70. 76—78. 89. 90.
 139.
 — (siehe auch Barthet und Bierry und
 Gruzewska und Bierry).
 — und Barthet 78.
 — und Giaja 70. 134. 140.
 — und Henri 89. 139. 166. 305.
 — und Ranc 70.
 — und Salazar 75.
 — und Scheffer 70.
 Biffen 468.
 Bigelow und Mc. Elroy 44.
 Billard (siehe Argand und Billard).
 Billon (siehe Stassano und Billon).
 Biltz, W. 108. 110.
 Binder 116.
 Binet (siehe Ambard und Binet).
 — (siehe Enriquez und Binet).
 Binswanger 369.
 Biondi 448.
 Biot 124.
 Bisgaard und Korsbjerg 369.
 Bitnii-Schljachto 460. 468.
 Bitter 128. 277.
 Bittorf 242. 322.
 Blaizot 294. 307.
 Blanc 339.
 Bloch und Massini 349. 434.
 Blood 168.
 — (siehe auch Mendel und Blood).
 — (siehe auch Mendel, Chapman und
 Blood).
 Blum und Boehme 261.
 — und Fuld 280. 283. 318. 333.
 Blumenthal (siehe Aronsohn und Blumen-
 thal).
 — Jacoby und Neuberg 244.
 Blumenthal und Neuberg 244.
 — und Wolff 244.
 Boas 169. 280. 282.
 Boden (siehe Windisch und Boden).
 Bodenstein 57. 58.
 — und Dietz 57. 496. 502—504.
 Bodin und Lenormand 276.
 Bodong (siehe Schittenhelm und Bodong).
 Boehm 241.
 Boehme (siehe Blum und Boehme).
 Boerhave 156. 436.
 Böttcher (siehe Kuhn, Thomas und
 Böttcher).
 Bogdandy 210.
 Boggs (siehe Morris und Boggs).
 Bokay 465.
 Bokorny 50. 60. 75.
 Boldyreff 459. 478.
 Bolognesi (siehe Remedi und Bolognesi).
 Bonano 459.
 Bondi und Salomon 479.
 Bondonneau 124.
 Bonfanti (siehe Ascoli und Bonfanti).
 Bonnoire 458.
 Bordet 340. 363. 423. 424.
 — und Delange 292. 310.
 — und Gengou 296. 300. 301. 316. 317.
 362.
 Borissow 187. 192. 472. 490.
 Bornand (siehe Galli-Valerio und Bor-
 nand).
 Bornstein (siehe Köhler, Bornstein und
 Zielstorff).
 Borrino 452.
 — (siehe Herlitzka und Borrino).
 Borzi 468.
 Bostock 240.
 Bottazzi 112. 232. 234.
 — und Victorow 112.
 Bouchardat 151.
 Bouchut (siehe Wurtz und Bouchut).
 Boullanger 276.
 Boullay (siehe Dumas und Boullay).
 Bourquelot 42. 52. 61. 77. 80. 82. 134.
 135. 140. 142. 147. 420.
 — und Bridel 77. 151. 153.
 — und Danjou 151.
 — und Gley 69.
 — und Hérisssey 60. 69. 77. 133. 135.
 276. 522.
 Boutron und Frémy 155.
 — und Robiquet 156.
 Boutron-Chalard 142.
 Boye (siehe Emile-Weil und Boye).
 Brachin 69. 72.
 Bradley 115. 249. 462. 502.
 Bradshaw (siehe Mellor und Bradshaw).
 Brahm 446 (siehe auch Abderhalden und
 Brahm, Freund und Brahm, Schitten-
 helm und Brahm).

- Brasse 82. 140.
 Bräuler 285.
 Braun, H. 344. 352. 362. 366. 373. 468. 469.
 — und Behrendt 468.
 Braunstein 324.
 — und Kepinow 317.
 Bredig 7.
 — und Fiske 153.
 Bremer (siehe Spieckermann und Bremer).
 Brenner 323.
 Breslauer und Woker 247.
 Breton 308.
 Bridel (siehe Bourquelot und Bridel).
 Brieger und Fränkel 352.
 — und Trebing 321. 323. 326.
 Briot 261. 263. 264. 275. 319. 320.
 Brocq, Rousseu und Gain 82.
 Brodie (siehe auch Halliburton und Brodie).
 Brodie und Russel 303.
 Bronstein 382.
 Brown 58. 133.
 — und Glendinning 83. 84.
 — und Heron 44. 53. 85. 93. 126.
 — und Millar 123. 125. 173. 175.
 — und Morris 53. 80. 81. 123. 125. 126. 132.
 Browne 275.
 Bruck (siehe Wassermann und Bruck).
 Brücke 125. 161. 180. 181.
 Brüll 248.
 Brugnatelli 313.
 Brugsch 449. 459. 461.
 — (siehe auch Umber und Brugsch).
 — und Masuda 170. 465.
 Brunacci 89. 116.
 Bruno 461.
 Brunton und Macfadyan 276.
 Bruschi 277.
 de Bruyne 398. 399.
 Bubanovic (siehe Hamburger, de Haan und Bubanovic).
 Buchanan 290.
 Buchner 15. 42. 237. 276. 277. 439. 453.
 — und Haehn 315.
 — und Hahn 15. 276. 277.
 — und Hoffmann, R. 237. 277.
 — und Klatte 237. 277.
 — und Meisenheimer 52.
 — und Rapp 82. 128.
 Buckmaster 303.
 Bürgi 334.
 Bürker 303. 309.
 Büsgen 128.
 Bütschli 430.
 Bufalini 276.
 Buglia 89. 296.
 Bull 152.
 Buller 128.
 Bunge 3.
 Burckhardt, J. L. 356.
 Burge 262. 267.
 Burger 114.
 Burian 458.
 Burow 264.
 Burri 444.
 Buscaglioni (siehe Fermi und Buscaglioni).
 Bussy 155.
 Butkewitsch 82. 238. 239.
 Buxton und Shaffer 469.
 Bywaters (siehe Pavy und Bywaters).
 — und Waller 92.
 Caemmerer 231 (siehe auch Abderhalden, Caemmerer und Fincussohn).
 Cagnard de Latour 14.
 van Calcar 194. 403.
 Caldwell 275.
 — und Courtauld 141.
 Calmette 128.
 Campbell (siehe Osborne und Campbell).
 Camus 468 (siehe auch Hanriot und Camus).
 — und Gley 304. 305. 318.
 — und Nicloux 459.
 Canby 275.
 Cannon und Day 87. 105.
 Cantacuzène 423.
 — und Jonescu-Mihaiesti 321.
 Capelli und Cristoforetti 242.
 Capparelli 233.
 Carlson und Chittenden 115.
 Carpi 322.
 Carrière 466. 469. 489.
 Cash 459.
 Caspari (siehe Neuberg, Caspari u. Löhe).
 Castelli 356.
 Cathcart 308.
 Centanni 89.
 Chaim (siehe Herrmann und Chaim).
 Champenois 133.
 Chanoz und Doyon 285. 296. 493. 494.
 Chapman (siehe Mendel, Chapman und Blood).
 — (siehe Moseley und Chapman).
 — (siehe Welsh und Chapman).
 Charlier 140.
 Charrin und Levaditi 318.
 Chauchard und Mazone 94.
 Chiari 240. 247.
 Chiarolanza 315.
 — (siehe auch Fazio und Chiarolanza).
 Chigin und Lobassow 195.
 Chistoni (siehe Vinci und Chistoni).
 Chittenden 275.
 — (siehe auch Carlson und Chittenden).
 — und Ely 87. 88.
 — und Griswold 87.
 — und Hutchinson 91.

- Chittenden und Martin 94.
 — Mendel und Dermott 275.
 — und Painter 92.
 — und Smith, H. E. 87. 88. 92.
 — und Stewart 92.
 Chodat 161. 175.
 — und Rouge 278.
 Christiani 114.
 Christiansen, Johanne 183. 197. 233.
 Chrzaszcz 81. 82.
 — und Pierozek 95. 101.
 Ciaccio 254.
 Cipollina 36.
 Citron 335.
 — (siehe auch Wassermann und Citron).
 Citronblatt 321.
 Clark 118 (siehe auch Kastle und Clark).
 Clément und Désormes 8.
 Clémenti 465.
 Clerc (siehe Achard und Clerc).
 Claude-Bernard 53. 151. 419. 458.
 Claus 402.
 Clausius 118.
 Clausz (siehe Kämmerer, Clausz und Dieterich).
 Cobb 187.
 Cobliner 325.
 Coggi (siehe Pugliesi und Coggi).
 Cohn 275.
 — (siehe auch Ellinger und Cohn).
 — (siehe auch Heinze und Cohn).
 — (siehe auch Liefmann und Cohn).
 Cohnheim 79. 116. 206. 233. 235. 294. 305. 306.
 — und Pletnew 224.
 Cohnstein und Michaelis 458. 490.
 Col und Gerber 278.
 Cole 47. 86. 87. 90.
 — (siehe auch Hopkins und Cole).
 Colin 77.
 Collingwood und Mc. Mahon 292.
 Mac Collum und Hart 499.
 Columella 255.
 Colwell 225. 248. 249.
 — und Mc. Cormac 172.
 Compton (siehe Bertrand und Compton).
 Conn 276.
 Connstein 462. 463. 468.
 — Hoyer und Wartenberg 473.
 Conradi 245. 294. 310. 316.
 Coriat 465.
 Mc. Cormac (siehe Colwell und Mc. Cormac).
 Corsini 324.
 Courant 268. 272.
 Court 174.
 Courtauld (siehe Caldwell und Courtauld).
 Couvreur 256.
 Cowie 309.
 Cramer (siehe auch Bearn und Cramer).
 Cramer und Pringle 310.
 de Crinis (siehe Pregl und de Crinis).
 Cripps 102.
 Cristoforetti (siehe Capelli und Cristoforetti).
 Croner 200.
 Cruickshank 244. 249.
 Cuénot 417. 418.
 Cuisinier und Géduld 61.
 Curtius 224.
 Cytronberg 497.
 Czapek 52. 133. 274. 468.
 Dakin 438. 498.
 — (siehe auch Kossel und Dakin).
 Dale 434.
 van Dam 258. 265—268. 270—272. 284. 285.
 Dammhahn (siehe Abderhalden und Dammhahn).
 Danilewsky 79. 328.
 — und Hari 533.
 Danjou (siehe Bourquelot und Danjou).
 Darwin 275.
 Dastre 295.
 — und Stassano 306. 308. 309.
 Daumas (siehe Stassano und Daumas).
 Davidsohn 459. 492.
 — (siehe Michaelis und Davidsohn).
 Day (siehe Cannon und Day).
 Dean 168. 134. 135.
 Decio 381.
 Deetjen 310.
 — (siehe auch Abderhalden und Deetjen).
 — und Fränkel 381. 389.
 Defresne 80.
 Delange (siehe Bordet und Delange).
 Delbrück 468.
 Deleano 468.
 Délézanne 261. 297. 300. 304—306. 308. 310. 312.
 — und Frouin 304.
 — und Ledebt 358.
 — und Mouton 168. 309. 329.
 — Mouton und Pozerski 237. 278.
 — und Pozerski 307—311.
 Delrez 240.
 Denis 294.
 Dermott (siehe Chittenden, Mendel und Dermott).
 Dernikos (siehe Pringsheim und Dernikos).
 Désormes (siehe Clément und Désormes).
 Detmer 81. 87. 89. 92. 102.
 Deutsch, Detre 422.
 Deycax (siehe Parmentier und Deycax).
 Dezani 314.
 Dick 322.
 Dickinson 301.
 Dienert 75.
 Dierssen 64.

- Diesselhorst (siehe Trebing und Diesselhorst).
 Dieterich (siehe Kämmerer, Clausz und Dieterich).
 Dietz 213. 266.
 — und Bodenstein (siehe Bodenstein und Dietz).
 Dimmock (siehe Dunstan und Dimmock).
 Dioskorides 254. 255.
 Doberauer 313.
 Dobson (siehe Robertson, Irvine und Dobson).
 Dochez (siehe Opie, Barker und Dochez).
 Döbereiner 4. 5.
 Döblin 170. 317. 324.
 Dold und Ungermann 352.
 Donath, Ed. 42. 119. 124.
 — Hedwig 461. 475. 481.
 Dormeyer 253.
 Dox 128. 453.
 — und Golden 499.
 — und Neidig 62.
 Doxiades 63.
 Doyon 294. 308. 316.
 — (siehe auch Chanoz und Doyon).
 — Dubrulle und Sarvonat 294. 317.
 — Morel und Péju 302.
 — Morel und Policard 308.
 — und Morel 462. 489. 493. 495.
 — und Takamine 377.
 Dragendorff 134.
 Dreibholz 442.
 van den Driessen Marleuw 468.
 Drjewecki 247.
 Dubosq 441.
 Dubourg (siehe Gayon und Dubourg).
 Dubrulle (siehe Doyon, Dubrulle und Sarvonat).
 Dubrunfaut 79. 127.
 Ducceschi 263.
 Ducker 83. 85. 87.
 Duclaux 47. 56. 169. 276. 505.
 Dudgeon, Panton und Wilson 359.
 Dumas und Boullay 52.
 v. Dungern 318. 377.
 — und Hirschfeld 365.
 Dunham (siehe Mandel und Dunham).
 Dunlap und Seymour 468.
 Dunstan und Dimmock 102.
 Duquesnel 79.
 Dzierzowski (siehe Sieber Nadina und Dzierzowski).
 Eberle 458.
 Ebrill (siehe Ryan und Ebrill).
 Ebstein und Grützner 161. 182.
 — und Karl Schulze 87.
 Edelstein (siehe Löwenthal und Edelstein).
 Edkins 262.
 Edmonds 54.
 Effront 87—89. 91. 132. 276.
 — und Bücheler 43. 88. 101.
 Ehrenreich 227. 311.
 — (siehe Michaelis und Ehrenreich).
 Ehrlich 26. 27. 322. 427. 429.
 Ehrmann 477.
 — und Lederer 478.
 Eijkman 277.
 Einhorn 206. 449. 479.
 Einstein 41. 257.
 v. Eisler 264. 319.
 Eisner 321.
 — (siehe auch Pringsheim und Eisner).
 van Ekenstein (siehe Lobry de Bruyn und van Ekenstein).
 Elias 367.
 Ellermann und Erlandsen 354.
 Ellinger und Cohn 304.
 Ellinger und Flament 173.
 Mc. Elroy (siehe Bigelow und Mc. Elroy).
 Elvove (siehe Kastle, Johnston und Elvove und Kastle, Loevenhart und Elvove).
 Ely (siehe Chittenden und Ely).
 Emerson 249.
 Emile-Weil und Boye 294. 309.
 Emmerling 19. 63. 278. 522.
 — (siehe auch Abderhalden und Emmerling).
 — und Reiser 277.
 Engel 256. 268. 472.
 — (siehe auch Schloßmann und Engel).
 Enriquez und Binet 118.
 Epilrand 380.
 Eppenstein (siehe Stern und Eppenstein).
 Erikson 54.
 Erlandsen (siehe Ellermann und Erlandsen).
 Erlenmeyer 54. 82.
 Esbach 199.
 Escherich 241. 322.
 Esmonet (siehe Loeper und Esmonet).
 Ettinger (siehe Laqueur und Ettinger).
 Eugling 272.
 Euler, Astr. und H. 10. 55. 57. 62. 64. 75. 118. 133. 154. 161. 177. 186. 188. 191. 195. 213. 229. 230. 232. 233. 480. 496. 503.
 — H. und Johansson 42. 47.
 — H. und Kullberg 42. 47.
 — H., Lindberg und Melander 44.
 — H. und H. Meyer 43.
 — H. und Beth af Uggla 47.
 Euripides 255.
 Evans 94. 103.
 Eve 326.
 Ewald 280. 501.

- Fajans** 153.
Falk 382.
 — (siehe Bergell und Falk).
 — und Nelson 473. 480.
Fallose 232. 233. 420. 459.
Fano 301.
Farmer (siehe Kendall und Farmer).
Faubel 190.
Fauré 156.
Fausser 369. 382.
Fazio und Chiarolanza 324.
Fehling 12. 45. 68. 73. 84. 97. 98. 137.
 139. 289. 520. 525. 526. 529.
Feistmann 93.
v. Fellenberg 45. 46.
Fellmer, Toni 354 (siehe auch Wendel-
 stadt und Fellmer, Toni).
Fellner 434.
Fermi 52. 79. 128. 164. 166. 201. 237.
 277. 313. 318.
 — und Buscaglioni 276.
 — und Montesano 52.
 — und Pampersi 276.
 — und Pernossi 298. 318.
Fernbach 51. 52. 138.
 — und Schoen 80.
 — und Wolff 87. 88. 90. 93. 101. 112.
 113. 124. 140.
 — (siehe auch Wolff und Fernbach).
Ferrari 382.
Ferro (siehe Petteruti und Ferro).
Ficai (siehe Loeper und Fikai).
Fichtenholz 152.
Ficker 335. 341.
Fiehe 46.
Fiessinger und Marie 461. 462.
Filehne 241. 322.
Finizio 459.
Fiori 314. 316.
Fischer, Emil 19. 32. 35. 36. 60—64. 71.
 75. 157. 252. 522.
 — E. und Abderhalden 169. 224.
 — E. und Armstrong 69. 75.
 — E. und Lindner 52. 60. 61. 76.
 — E. und Niebel 53.
 — E. und Zach 34. 149.
 — E. und Zemplen, Geza 33. 76.
 — (siehe Neubauer und Fischer).
 — H. 113.
 — J. 369.
Fischler 313.
Fiske (siehe Bredig und Fiske).
Fitz und Hueppe 276.
Flamand (siehe Ellinger und Flamand).
Flatow 381.
Fleckseider 459.
Fleisher (siehe Loeb und Fleisher).
Fleury 474.
Foà 70. 234. 292. 298. 310.
 — und Levi 298.
Fokin 468.
Fokker 277.
Folin 174. 438. 441.
Ford 86. 88.
 — und Guthrie 88.
Fossati 461.
Fouard 89. 108. 112. 113.
Fourcroy und Vauquelin 436.
Fränkel 352. 363.
 — (siehe auch Brieger und Fränkel und
 Deetjen und Fränkel).
 — und Hamburg 79. 81.
Fränznick 443.
Frank 296.
Frank, K. (siehe Wolff, M. und Frank, K.)
Frank und Schittenhelm 170.
Franke 204.
 — und Sabatowski 204.
Franz, F. 309. 316.
Frassi 459.
Fraunhofer 217.
Frédéricq 292.
Frederikse 294.
Fremy 135.
Frenzel 401. 404. 406. 408. 413.
Fresemann 311.
Freudenreich 270.
Freund 347.
 — (siehe Abderhalden, Freund und Pin-
 cussohn).
 — (siehe Fuchs und Freund).
 — und Brahm 382.
 — und Kaminer 321.
Freundlich 512.
Friedberg 467.
Friedberger 351. 354.
 — und Castelli 356.
 — und Mita 350.
 — und Moereschi 352.
 — und Nathan 351.
Friedemann 464.
 — und Friedenthal 296.
 — und Isaac 349.
Friedenthal 298.
 — (siehe auch Friedemann und Frieden-
 thal).
 — und Mijamota 298.
Friedheim 256.
v. Friedrichs 122.
Friend (siehe Halliburton und Friend).
Fröhlich 247.
Frouin 459.
 — (siehe auch Thomas und Frouin).
 — und Thomas 151.
Fruhinsoltz (siehe Garnier und Fruhins-
 holtz).
Fry 309.
Fubini 141.
Fuchs A. 381.
 — (siehe auch Lampé und Fuchs).

- Fuchs und Freund 369.
 — W. (siehe auch Margosches und Fuchs).
 Fürstenberg und Trebing 324.
 v. Fürth und Schütz, J. 461. 464.
 — und Schwarz 313.
 Fuhrmann 52. 128. 274. 466.
 Fukuhara 347.
 Fuld 187. 203. 205. 237. 256. 257. 272.
 280. 283. 284. 286. 287. 291. 297. 300.
 310. 311. 321. 326.
 — (siehe auch Blum und Fuld).
 — Bergmann und K. Meyer 203.
 — und Hirayama 205. 281.
 — und Levison 203. 205.
 — und Pincussohn 258.
 — und Schlesinger 303.
 — und Spiro 257. 291. 316. 319—321.
 — und Wohlgemuth 268.
 Funk und Niemann 261.

 Gabler-Saliter 283.
 Gadamer 156.
 Gaifami 382.
 Gain (siehe Brocq, Rousseu und Gain,
 sowie Apsit und Gain).
 Calambos 118.
 Galdi 250.
 Galeotti 110.
 Galli-Valerio und Bornand 340.
 Gamgee 458.
 Gans 87. 88.
 Garnier 468—470. 488. 489.
 — und Fruhinsholtz 488.
 Gastaldi (siehe Satta und Gastaldi).
 Gaston-Durand 116.
 Gatin-Gruzewska 111. 113.
 Gatin-Gruzewska, A. Mayer und G.
 Schaeffer 113.
 Gaucher 259.
 Gautier 169.
 Gawalowski 99.
 Gayon 52.
 — und Dubourg 82.
 Geddert (siehe Abderhalden und Geddert).
 Géduld (siehe Cuisinier und Géduld).
 Gehrig 167.
 Geißler 367. 368. 373.
 Gengou (siehe Bordet und Gengou).
 Gérard 140. 141. 468.
 Gerard und Leroy 494.
 Gerber 90. 92. 263. 270. 271. 275. 277.
 278. 285. 320. 329. 468.
 — (siehe auch Col und Gerber).
 — und Berg 272.
 — und Daumézou 274.
 — und Flourens 276.
 Geret (siehe Hahn und Geret).
 Geslin (siehe Wolff und Geslin).
 Gessard 292.
 — und Wolff 93.

 Gewin 260. 262.
 Ghedini 117.
 Giaja 152.
 — (siehe auch Bierry und Giaja).
 — und Gompel 77.
 Gjaldbaek (siehe Henriques und Gjald-
 baek).
 Giganti 459.
 Gigon (siehe Abderhalden und Gigon).
 — und Rosenberg 91.
 Gillot 77.
 Girard 80.
 Glaesner 260. 261. 304. 318. 319. 458. 459.
 — und Popper 451.
 — und Stauber 231.
 Glagolew 328. 330.
 Glendinning (siehe Brown und Glendin-
 ning, Moritz und Glendinning).
 Glenn (siehe Mathews und Glenn).
 Gley 258. 262. 321.
 — (siehe Bourquelot und Gley).
 — (siehe Camus und Gley).
 Glikin und Loewy 241.
 Glimm (siehe Wohl und Glimm).
 Glover (siehe Armstrong und Glover).
 Glücksmann 342.
 Mc Gnigon 88.
 Goebel 92.
 Gofflin 95.
 Golden (siehe Dox und Golden).
 Goldschmidt, H. und R. 191. 204. 499.
 Golla 324.
 Gompel (siehe Giaja und Gompel).
 Gonnermann 82. 140.
 Gonzaley (siehe Turro und Gonzaley).
 Goodman 452.
 Goret 133.
 Gorini 277.
 v. Gorup-Besanez 82. 275.
 — und Will 82.
 Gottlieb und Stangassinger 439—442.
 Goyand 135.
 Grafenberg 325.
 Graetz, F. 355.
 Graham 466.
 Gramenitzki 94.
 Gran 135.
 Grasmann 478. 479.
 Green 94. 133. 134. 274. 276. 474.
 Green-Windisch 133.
 Gregersen 456.
 Grezes 42.
 Grigorescu 367.
 Grigorjew (siehe Gromow und Grigor-
 jew).
 Grimaux und Lefèvre 522.
 Grimm 474.
 Grimmer 239.
 Griniew 117. 481.
 Grisson 141.

- Griswold (siehe Chittenden und Griswold).
 v. Gröer 277.
 Grohmann 290.
 Gromow und Grigorjew 276.
 Groner 181.
 Groß 171. 187. 203. 237. 326. 459. 479.
 — Oefele und Rosenberg 479.
 Großer und Husler 486.
 Großmann (siehe Kurajeff u. Großmann).
 Gruber 224. 341. 342.
 Grübler 332. 482. 484.
 Grünert 53.
 Grünhagen 176. 178. 179. 193.
 Grünhut und Riber 44.
 Größ 79. 80. 119. 132. 133. 136—138. 140.
 Grützner 80. 88. 176. 177. 179. 181. 193.
 195. 203. 204. 221. 260. 332. 391. 458.
 475.
 — (siehe auch Ebstein und Grützner).
 — und Wachsmann 90.
 Gruzewska 140.
 — (siehe auch Gatin-Gruzewska).
 — und Bierry 140.
 Gürber 194.
 Guggenheimer 382.
 Guidi 249.
 Mc Guigan 88.
 Guignard 150. 157.
 Guldberg und Waage 18.
 Guleke 313.
 — (siehe auch v. Bergmann und Guleke).
 Gunning 42.
 Guthrie (siehe Ford und Guthrie).
 Guto 478.
 Guyénot 24. 90.
 Guyot (siehe Bénech und Guyot).

 de Haan (siehe Hamburger, de Haan und
 Bubanovic).
 Haber und Löwe 216.
 Haberlandt 80.
 Haehn (siehe Buchner und Haehn).
 Hämaläinen und Sjöström 153.
 Haeren 459.
 Hager 102.
 Hahn 277. 318.
 — (siehe auch Buchner und Hahn).
 — und Geret 276. 449.
 Hall und Williamson 172.
 Halliburton und Brodie 299.
 — und Friend 299.
 Hamburg (siehe Fränkel und Hamburg).
 Hamburger 61. 165. 234. 321. 490.
 — (siehe auch Moro und Hamburger).
 — de Haan und Bubanovic 359.
 — und Hekma 233. 304. 305.
 Hamill 304. 308. 317. 318.
 Hammarsten 139. 164. 203. 246. 254. 256.
 257. 261. 264. 266. 268. 284. 290. 291.
 293—296. 298—300.

 Hammerschlag 197. 199.
 Hamsik 461. 463. 480—482. 500—502. 506.
 Handovsky (siehe Pauli und Handovsky).
 Hanford 105.
 Hankin und Westbrook 166. 276.
 Hannes und Jodlbauer 48.
 Hanriot 20. 460. 488. 501. 502.
 — und Camus 460. 488.
 Hansen 82. 275. 276.
 Hansen und Soxhlet 284.
 Hara 377.
 Harden und Paine 128.
 Hardy 341.
 Hári (siehe Danilewski und Hári).
 Harlay 175. 275.
 Harlow und Stiles 95.
 Harrison 44. 111. 121.
 Hart und Mc. Collum (siehe Mc. Collum
 und Hart).
 Hartig 82. 133.
 van Hasselt 262. 263. 266.
 Hata 91. 206. 246.
 Hattori 227.
 Hawk 105. 116. 259.
 Haworth und Law 520.
 — und Leitch 508. 509.
 Hébert 151.
 Hecht 488.
 Hedin 162. 190. 200. 213. 234. 261. 264.
 315. 316. 320.
 — und Masai 234.
 — und Rowland 246.
 Hédon 324.
 Hegner 382.
 von der Heide und Krösing 325.
 Heidenhain 407.
 Heile 249.
 Heilner 311. 349.
 — und Petri 382.
 Heinricher 157.
 Heinsheimer 459.
 Heintz 254.
 Heinze und Cohn 69.
 Heise (siehe Abderhalden und Heise).
 Hekma 304. 305.
 — (siehe auch Hamburger und Hekma).
 Heller (siehe Moore-Heller).
 van Belmont 1.
 Hempel 269.
 Hendry (siehe Schlimpert und Hendry).
 Henneberg 128.
 Henri 154.
 — (siehe auch Bierry und Henri).
 — Michaelis und Menten 46.
 — und Nicloux 474.
 Henri, V. 45. 47. 56—58. 62. 83. 84.
 — und Larguier des Bancelis 190. 209.
 213. 229.
 — und Philoche 63.
 — und Terroine 62.

- Henriques und Gjaldbaek 219. 328. 330.
 Henrotin 196. 206.
 Henry (siehe Bierry, Giaja und Henry).
 — und Auld 148.
 Hensay 105.
 Hensel 308.
 Hepburn (siehe Pennington und Hepburn)
 Herdi 254. 255. 274.
 d'Herelle 430. 432. 433.
 Hérissé 60. 141. 147. 151.
 — (siehe auch Bourquelot und Hérissé).
 Heritsch 495.
 Herlitzka und Borrino 298.
 Heron (siehe Brown und Heron).
 Herrmann und Chaim 330.
 Hertel 264.
 van Herwerden 256. 459.
 Herzfeld 125. 220. 321. 385.
 Herzog 152. 258. 328.
 — und Margolis 192. 214.
 Herzog, R. O. 41. 58. 65. 192. 195. 210.
 228. 229. 261. 472. 501.
 — Becker und Kasarnowski 63. 65.
 — und Kasarnowski 41. 55. 190. 227.
 229. 257.
 Heß 12. 110. 116. 140. 208. 313.
 — und Saxl 244. 248. 249.
 v. Heß 470.
 Hesse 449.
 Heubner 293. 294.
 Heusch 88.
 Hewlett 310. 464. 470.
 Heyde 349.
 Higuchi 493.
 Hildebrandt 117. 152. 153. 156. 397.
 Hill Croft 19. 61. 63. 522.
 Hillmann 256. 257. 533.
 Hinman und Sladen 303.
 Hjort 277.
 Hirata 115. 328.
 Hirayama 116.
 — (siehe auch Fuld und Hirayama).
 Hirsch, P. 217. 275. 372. 391. 394. 395.
 443.
 — Rahel und Leschke 370.
 Hirsch-Beck 208.
 Hirschfeld (siehe v. Dungern und Hirschfeld).
 Hirschler 275.
 Höber 270. 271.
 Hönig 512. 520.
 — und Schubert 521.
 van't Hoff 18. 19. 153.
 Hoffmann 165.
 — Eva 116.
 — R. 174.
 — R. (siehe auch Buchner und Hoffmann, R.).
 Hoffmann-La Roche 225.
 Hofmann 59. 156.
 Hofmeister 86. 188.
 Holderer 138.
 — (siehe auch Bertrand und Holderer).
 Holzmann (siehe Much und Holzmann).
 Homer 254.
 Hooker 275.
 Hopkins und Cole 173.
 Hoppe-Seyler 42.
 Hort 322. 324.
 Horton (siehe Armstrong und Horton).
 Hougardy 309.
 Howell 292. 293. 298. 303.
 Hoyer 474. 480.
 — (siehe auch Connstein, Hoyer und Wartenberg).
 Hubatka 156.
 Huber (siehe Arthus und Huber).
 Hudson 47. 48. 54—56. 59.
 — und Paine 48. 50. 51. 151. 154.
 Hüfner 10. 41. 118.
 Hueppe (siehe Fitz und Hueppe).
 Huerra 62.
 Hughes Griffith 275.
 Huiskamp 294. 298.
 Huntemüller 26.
 Hunter (siehe Abderhalden und Hunter).
 Huppert (siehe Schütz, E. und Huppert).
 Hurwitz (siehe Karrer und Hurwitz).
 Husler (siehe Großer und Husler).
 Huss 466.
 Hutchinson (siehe Chittenden und Hutchinson).
 Ibrahim und Kopec 459.
 Ide Manile 401.
 Ilgorow 499.
 Illoway 182. 223.
 Immisch (siehe Abderhalden und Immisch).
 Irvine 79.
 — (siehe auch Robertson, Irvine und Dobson).
 — und Steele 520.
 Isaac (siehe Friedemann und Isaac).
 Isaja 317.
 Isbert (siehe Stutzer und Isbert).
 Iscovesco 296.
 Israel (siehe Abderhalden und Israel).
 Issajew 42.
 Iwanow 277. 453. 501.
 Izar 248. 249. 346. 460. 490.
 — (siehe auch Ascoli und Izar).
 Jacobsen 11.
 Jacobsohn, J. (siehe Mühsam und Jacobsohn).
 Jacoby 107. 119. 166. 206. 214. 241. 244.
 245. 251. 258. 261. 318.
 — (siehe auch Blumenthal, Jacoby und Neuberg).

- Jacoby (siehe auch v. Kaufmann, Lewite, Jacoby und Sallinger).
 — und Soetbeer (siehe Soetbeer und Jacoby).
 Jacque und Woodgatt 171.
 Jackson 240.
 Jaeggy 234.
 Jaffé 441.
 v. Jaksch 35. 116. 165.
 Jalandar 473. 474. 480. 501. 502.
 Jansen 459.
 Javillier 168. 264. 276. 320.
 Jawein 114.
 Jelinek (siehe Stoklasa, Jelinek und Vitek).
 Jensen 466.
 Jersatschenko 371.
 Jessen-Hansen (siehe Sörensen und Jessen-Hansen).
 Joachimoglu 349.
 Jobling 249.
 Jochmann 250. 315. 322.
 — (siehe auch Müller und Jochmann und Ziegler und Jochmann).
 — und Kantorowicz 315.
 — und Lockemann 250. 315.
 — und Muller 250. 315.
 — und Ziegler 250. 315.
 Jodlbauer 47. 48.
 — und Hannes (siehe Hannes und Jodlbauer).
 Johannasson 282.
 Johansson (siehe Euler und Johansson).
 John 88.
 Johnson 102. 282.
 Johnston (siehe Kastle, Johnston und Elvove).
 Jolles, Ad. 6.
 — und Oppenheimer 6.
 Jona 54.
 Jonas 382.
 Jones 136. 443. 445. 450.
 — (siehe auch Amberg und Jones, Straughn und Jones und Vögtlin und Jones).
 — und Austrian 443.
 — Patridge 443.
 — und Winternitz 443.
 Jonesco, H. (siehe Babes und Jonesco).
 Jonescu 237. 278.
 Jonescu-Mihaiesti (siehe Cantacuzène und Jonescu-Mihaiesti).
 Jordis 194.
 Joseph und Pringsheim 317.
 Joubert (siehe Pasteur und Joubert).
 Jourevitsch und Rosenberg 370.
 Jung 197.
 Justschenko 369. 453. 461. 464. 470.
 Kadjikoff 304.
 Kämmerer 325. 328.
 — und Aubry 325.
 — Clausz und Dieterich 381.
 — und Mogulesko 315.
 Kämpf (siehe Abderhalden und Kampf).
 Kafka 114. 369. 461.
 — und Pförringer 372. 381.
 Kagan, Helene 207.
 Kaiserling 193.
 Kalaboukoff und Terroine 459. 461. 464. 465. 475. 484.
 Kalanther 52. 61.
 Kalischer 277.
 Kaminer (siehe Freund, E. und Kaminer).
 Kammann 349. 468.
 Kanitz 59. 473. 475. 481.
 Kantorowicz 166. 313.
 — (siehe Jochmann und Kantorowicz).
 Kapfberger (siehe Abderhalden und Kapfberger).
 Kapsenberg 349.
 Karczag (siehe Neuberg und Karczag).
 Karrer 273. 506—513. 518. 520. 522—524. 530—532.
 — und Hurwitz 534.
 — und Lang Lina 520.
 — und Nageli 508. 510.
 — Staub und Wälti 520.
 Kasanzeff 240.
 Kasarnowski (siehe Herzog, R. O. und Kasarnowski).
 Kaschiwabara 241. 248.
 Kaschiwado 449.
 Kastle 462. 496.
 — und Clark 53.
 — Johnston und Elvove 496. 500. 501. 505.
 — und Loevenhart 20. 472. 482. 496.
 — Loevenhart und Elvove 495. 501.
 Kathe 313.
 Katz 82. 527.
 Katzenstein 313. 314. 316.
 v. Kaufmann 12. 119—122. 196.
 — und Lewite 119.
 — Lewite, Jacoby und Sallinger 535.
 Kawashima 318.
 Kawastina 324.
 Kayser, H. (siehe Schwartz, G. und Kayser, H.).
 Kean 133.
 Kellner, Mori und Nagaoka 128.
 Kendall und Farmer 277.
 — und Sherman 84. 94.
 Mc. Kendrick 352.
 Kenthe 449.
 Kepinow 244. 248.
 — (siehe auch Braunstein und Kepinow).
 Kiesel 436. 438.

- Kjeldahl 43. 44. 82. 87. 88. 91. 92. 94.
 200. 201. 218. 239. 243. 245. 258. 439.
 Kikkoi 272. 453.
 King 382.
 Kirchheim 313.
 Kirchhoff 79.
 Kisch 42.
 Kita 128.
 Kiutsi Miki (siehe Abderhalden und
 Kiutsi Miki).
 Klassen und Syniewski 530. 531.
 Klatte (siehe Buchner und Klatte).
 Kleiner (siehe Mendel und Kleiner).
 Klemperer und Scheuerlen 459.
 Klempin 83. 94.
 — (siehe auch Aron und Klempin).
 Klieneberger und Scholz 322.
 Klug 214. 314. 323. 324.
 — (siehe auch Krause und Klug).
 Knauth 134. 459. 461.
 Kniakof 166.
 Kober 175. 219.
 Kobert 140. 536.
 Koblanck und W. Löb 224.
 Koch 395.
 Kocher, Th. 466.
 Köbner 53.
 Kohler, Adrienne 240. 244. 430.
 — Bornstein und Zielstorff 252.
 Koelker 171. 277. 478.
 — (siehe auch Abderhalden und Koelker).
 Kölle 41.
 König 99. 522.
 Koenigsfeld (siehe Neißer und Koenigs-
 feld).
 Korner (siehe Will und Körner).
 v. Körösy 349.
 Köster 256.
 Köttilitz 196. 273. 283. 285.
 Köttsdorfer 505. 506.
 Kohl 58.
 Kohnstamm 82. 133.
 Kolaczek (siehe Müller und Kolaczek).
 Kollmeyer 337.
 Kondo 497.
 — (siehe auch Zulkowsky und König).
 Kopaczewski 60.
 Kopec (siehe Ibrahim und Kopec).
 Korczyński 449. 478.
 Korentschewski 89.
 Korn, A. 176. 179. 181. 183. 184. 196. 199.
 Korotneff 398.
 Korsbjerg (siehe Bisgaard und Korsbjerg).
 Korschun 271. 306. 320. 322.
 Koslowsky 171.
 Kosmann 53. 82.
 Kossel 241. 443.
 — und Dakin 438.
 — und Pathen 457.
 Kottmann 241. 303.
 Kottmann und Lidsky 303.
 Kowalewsky 398.
 Kowarski (siehe Neumann und Ko-
 warski).
 Koziczkowski 477.
 Kramm (siehe Abderhalden und Kramm).
 Krasnogorski 332.
 Krauch 81. 82. 88.
 Kraus 449.
 — (siehe auch Biedl und Kraus).
 — und Levaditi 423.
 Krause 277.
 — und Klug 319.
 Kreidl und Lenk 268.
 Kröber (siehe Lintner und Kröber).
 Krösing (siehe von der Heide und
 Krösing).
 Kronecker 194.
 Krüger 53. 198. 200. 284. 445. 466.
 — M. und Reich, O. 437.
 Krukenberg 115. 276.
 Kruse 52. 128. 436. 466.
 Kübel 87. 88. 90. 99. 105.
 Kühn, Thomas und Böttcher 253.
 Kühne 161. 194. 235.
 Kütz 116.
 Künzel und Schittenhelm 443.
 Küttner 193. 464.
 Kulisch 395.
 Kullberg (siehe Euler und Kullberg).
 Kullgren 10. 118. 213.
 Kunze, M. 156.
 Kurajeff 328. 329.
 — und Großmann 328.
 Kußmaul 117.
 Kusumoto 140.
 Kutscher 168.
 — und Lohmann 465.
 — und Seemann 233.
 Kuttner und Pulvermacher 172.
 Kyes 465.
 Laborde 60.
 van Laer 84. 85. 95.
 Lafar 128.
 Lambert 170. 233. 493.
 Lampé 377. 381. 382. 386.
 — (siehe auch Abderhalden und Lampé).
 — und Fuchs 381.
 — und Papazolu 382.
 Landau und Rzasnicki 479.
 Landerer 164.
 Landois 321.
 Landsberg 292. 311.
 Landsteiner 315. 318. 319. 429.
 — und Prašek 341.
 Lane-Clayton 240.
 Lang 102.
 — (siehe auch Karrer und Lang, Lina).
 Lange, P. 382.

- Lange (siehe auch Ludwig und Lange).
 Langer 46. 340.
 Langerhans 421. 422.
 v. Langermarck (siehe Michaelis und v. Langermarck).
 Langhans (siehe Pringsheim und Langhans).
 Langley 86. 87. 105.
 Langstein und Soldin 234.
 Lapidus 89.
 Laqueur 241. 247. 256. 257. 260. 268. 459. 475.
 — und Brünecke 241.
 — Brünecke und Crampe 241.
 — und Ettinger 249.
 Larguier des Bancelis 299. 305.
 — (siehe auch Henri, V. und Larguier des Bancelis).
 Laroche (siehe Weinberg und Laroche).
 Laßmann (siehe Pringsheim und Laßmann).
 Laszlóffy (siehe Somló und Laszlóffy).
 Lattes 313.
 — (siehe auch Satta und Lattes).
 Laubenheimer (siehe Will und Laubenheimer).
 Lauber 277.
 Launay 115.
 Launoy 240. 244. 248. 251. 321. 324.
 Law (siehe Haworth und Law).
 Lawrow 329. 330.
 — und Salaskin 330.
 Laxa 468.
 Lazarus 277.
 Lea Sheridan 17. 85. 140. 194. 274. 436.
 Leavenworth (siehe Mandel und Leavenworth).
 Lebedew 95.
 van der Leck 263. 277.
 Ledebt (siehe Delezenne und Ledebt).
 Lederer (siehe Ehrmann und Lederer).
 Leers 338.
 Lefebvre 156.
 Lefèvre (siehe Grimaux und Lefèvre).
 Leffmann und Beam 88.
 Leitch (siehe Haworth und Leitch).
 Lenk (siehe Kreidl und Lenk).
 Lenk und Pollak 380.
 Lenormand (siehe Bodin und Lenormand).
 Leo 165. 167.
 Leonard und Jones 450.
 Lépine 117. 118.
 — und Barral 117.
 Leroy (siehe Gerard und Leroy).
 Leschke (siehe Hirsch, Rahel und Leschke).
 Mc. Lester (siehe Abderhalden und Mc. Lester).
 Leube und Beyerinck 436.
 Leuchs 116.
 Levaditi (siehe Charrin und Levaditi und Kraus und Levaditi).
 Levene 445. 446. 447. 451.
 — und Jacobs 446. 453.
 — und G. M. Mayer 64.
 — und Medigreceanu 445. 446. 456.
 — Medigreceanu und Jacobs 446.
 — und van Slyke 330.
 Leveux 298.
 Levi (siehe Foà und Levi).
 Levison (siehe Fuld und Levison).
 Lewin (siehe Bergell und Lewin).
 Lewinsky 478.
 Lewis (siehe Neilson und Lewis).
 Lewite (siehe v. Kaufmann und Lewite; v. Kaufmann, Lewite, Jacoby und Sallinger).
 Lewites 459.
 Lewkowitsch und Macleod 482.
 Liagre 240.
 Lichtenstein (siehe Pringsheim und Lichtenstein).
 Licini 314—316.
 Lidsky (siehe Kottmann und Lidsky).
 Lieberkuhn 232.
 Liebig 14. 255. 529. 530.
 — und Wöhler 142.
 Lieblein 316.
 Liebmann 206.
 Liefmann und Cohn 352.
 Liepmann (siehe Bergell und Liepmann).
 Lilienfeld 290. 294.
 Lillie 138.
 Limbosch (siehe Slosse und Limbosch).
 Lindberg (siehe Euler, Lindberg und Melander).
 Lindet 17.
 Lindner 52. 60. 76. 79. 81. 134.
 — (siehe Emil Fischer und Lindner).
 Lindstedt 394.
 Ling und Baker 64.
 Linossier 165. 187.
 Lintner 12. 38. 63. 89. 91. 93. 96. 113. 122—124. 140. 526.
 — und Düll 124—126.
 — und Kröber 60. 65.
 — und Sollied 101.
 — und Ch. Wirth 96.
 Lintwarew 461.
 Lisbonne 53. 91. 93.
 — und Vulquin 95.
 Litmanowicz und E. Müller 114.
 Lobassow (siehe Chigin und Lobassow).
 Lobry de Bruyn und van Ekenstein 65.
 Locke 258. 262.
 Loeb, J. 188. 189. 191.
 — Leo 292. 301. 310. 316.
 — (siehe auch Baer und Loeb).
 — und Fleischer 316.
 — und Smith 316.

- Löb, W. 92.
 — (siehe auch Koblanck und Löb W.)
 Löffler 352.
 Löhe (siehe Neuberg, Caspari und Löhe).
 Löhlein 190. 221. 222.
 Loeper und Esmonet 313.
 — und Ficai 118. 470. 488.
 Lörcher 261. 271.
 Loevenhart 257. 260. 268. 271. 460. 494. 495.
 — (siehe auch Amberg und Loevenhart).
 — (siehe auch Kastle und Loevenhart).
 — (siehe auch Kastle, Loevenhart und Elvove).
 — und Peirce 497.
 — und Souder 461. 464. 495.
 Löwe 216.
 — (siehe auch Haber und Löwe).
 Löwe-Zeiß 216. 393.
 Löwenthal und Edelstein 249.
 — und Wohlgemuth 92.
 Loewi, O. 115.
 Loewit 349.
 Loewy (siehe Glikin und Loewy).
 Löwy (siehe Phibram und Löwy).
 Lohmann (siehe Kutscher und Lohmann; Schneider und Lohmann).
 Lohschmidt 41.
 Lombroso 230. 305. 318. 459.
 Lommel 349.
 London 195. 329. 459.
 — (siehe auch Abderhalden, London und Vögtlin).
 — und Dobrowolskaja 195.
 — und Riwoch-Sandberg 195.
 — und Schittenhelm 452.
 — und Wersilowa 459.
 Longcope 324.
 Loos 398.
 Ludwig und Lange 156.
 Lüdy 493.
 v. Luetzelburg 275.
 Lugol 105. 106.
 Lukomnik 329.
 Lumia 468.
 Lundberg 271.
 Lusk 53.
 Lussana (siehe Abderhalden und Lussana).
 Macé 277.
 Macleod (siehe Lewkowitsch und Macleod).
 — und Pearce 115. 117.
 Macfadyan (siehe Brunton und Macfadyan).
 Macquaire 181.
 Madsen 283.
 — und Walbum 190. 284. 311.
 Maercker 127.
 Maggi 11. 85. 92. 93. 99. 101. 106. 108. 110. 112. 120. 122. 139. 186. 208. 523. 524. 527. 532. 535.
 — (siehe auch Woker und Maggi).
 Magi 312.
 Magnus 461. 463. 475. 493.
 Magnus-Levy 245.
 Mahlenberg 478.
 Mc Mahon (siehe Collingwood und Mac Mahon).
 Malfitano 276. 277.
 — und Lazarus 277.
 — und Moschkoff 108. 110. 124.
 Manabu Miyoshi (siehe Miyoshi Manabu).
 Mandel und Dunham 445.
 — und Leavenworth 461.
 Mandelbaum 166. 380.
 Manetti und Musso 289.
 Manfredi 52.
 Mansfeld 247. 463.
 Manwaring 349. 465.
 — (siehe auch Abderhalden und Manwaring).
 Maquenne 511. 523.
 — und Roux 87. 93. 111. 140.
 Marcet 459.
 Marcus 324.
 Margolis (siehe Herzog und Margolis).
 Margosches und Fuchs 512. 520.
 Marie 314. 316.
 — (siehe auch Fiessinger und Marie).
 Marino 118.
 — und Sericano 152.
 Marks 363.
 Marshall Ward (siehe Ward Marshall).
 Martin 275. 316. 430.
 — (siehe auch Chittenden und Martin).
 Martinelli 70.
 Marx (siehe Neuberg und Marx).
 Masai (siehe Hedin und Masai).
 Massini (siehe Bloch und Massini).
 Mastbaum 468.
 Masuda 41. 47.
 — (siehe auch Brugsch und Masuda).
 Maszewski 83.
 Mathes 312.
 Mathews und Glenn 41. 53.
 Mathieu 233.
 Mavrojanis 277.
 Mayer 382.
 — A. 47. 181. 257.
 — — (siehe auch Gatin-Gruzewska, Mayer, A. und Schaeffer, G.).
 — Anka (siehe Samec und Mayer, Anka).
 — G. M. (siehe Levene und Mayer, G. M.).
 — P. 465. 498.
 — Sigm. 398. 399.
 Mays 230. 298.

- Mazone (siehe Chauchard und Mazone).
 Medigreceanu (siehe Abderhalden, Rona, Medigreceanu und Pincussohn).
 Meisenheimer (siehe Buchner und Meisenheimer).
 Melander (siehe Euler, Lindberg und Melander).
 Melis-Schirru 469. 470. 491.
 Mellanby 260. 291. 299. 308. 441.
 — und Woolley 304.
 Mello (siehe Weinberg und Mello).
 Mellor und Bradshaw 55.
 Meloy (siehe Winternitz und Meloy).
 Melzer 466.
 Memmi 488.
 Menczes (siehe Bettencourt und Menczes).
 Mendel (siehe Chittenden, Mendel und Dermott).
 — und Blood 278.
 — Chapman und Blood 115.
 — und Kleiner 54.
 — und Mitchell 53. 443.
 — und Wells 443.
 Menschutkin 153.
 Menten (siehe Henri, Michaelis und Menten).
 Merck 62. 335. 455. 486.
 Mereshkowsky 50.
 v. Mering 53. 61. 116.
 — (siehe auch Musculus und v. Mering).
 Merklen (siehe Nobécourt und Merklen).
 Mesernitzky 277.
 Mesnil 318.
 Metschnikoff 162. 398. 399.
 Mett 11. 100. 165. 183. 185—187. 190. 192. 193. 195. 197. 268. 333.
 Meunier 210. 220.
 Meyer A. 111.
 — D. (siehe Schneidewind, Meyer, D. und Munter).
 — H. (siehe Euler und H. Meyer).
 — K. 187. 277. 317. 323—325. 365.
 — — (siehe auch v. Bergmann und Meyer, K. sowie Fuld, Bergmann und Meyer, K.).
 — L. F. 268.
 Mialhe 79. 116.
 Michaelis 48. 49. 273.
 — (siehe auch Abderhalden und Michaelis).
 — (siehe auch Cohnstein und Michaelis).
 — (siehe auch Henri, Michaelis und Menten).
 — (siehe auch Oppenheimer und Michaelis).
 — (siehe auch Rona und Michaelis).
 — und Davidsohn 48. 185.
 — und Ehrenreich 48.
 — und v. Langermarck 391.
 — und Oppenheimer 311.
 Michaelis und Rona 45. 349. 491.
 Micheli 328.
 Migay und Sawitsch 262.
 Mihara 141. 438. 453.
 Mijamota 298.
 Milchner (siehe Neuberg und Milchner).
 Milian 303.
 Millar (siehe Brown und Millar).
 Millon 150. 157. 174.
 Milroy 451.
 Minami 89. 307. 463. 481.
 Mintz 326.
 Mirto 338.
 Mita (siehe Friedberger und Mita).
 Mitchell 449.
 — (siehe auch Mendel und Mitchell sowie Sykes und Mitchell).
 Mitscherlich 4. 133.
 Miura 53.
 Miyoshi Manabu 133.
 Mörner 174.
 Mogulesko (siehe Kämmerer und Mogulesko).
 v. Mohl 111.
 Mohr 64. 221. 502.
 Moll 437.
 Molliard 53.
 Moncorvo 275.
 Montesano (siehe Fermi und Montesano).
 Moore 58. 501.
 — -Heller 12. 99. 525.
 Morawitz 291. 297—299. 303. 316.
 — und Bierich 303.
 Moreau 45. 46. 122. 125. 126.
 Morel (siehe Doyon, Morel und Policard; Doyon, Morel und Péju).
 — und Terroine 459. 495.
 Morgenroth 264. 282. 319. 320. 333.
 Mori (siehe Kellner, Mori und Nagaoka).
 Moriarta 103.
 Moritz 259. 438.
 — (siehe auch Biedermann und Moritz).
 — und Glendinning 85.
 Moro 264. 320. 331. 349.
 — und Hamburger 308.
 — und Tomono 351.
 Morren 275.
 Morris (siehe Brown und Morris).
 — und Boggs 462.
 Mosbacher und Port 382.
 Moschkoff (siehe Malfitano und Moschkoff).
 Moseley und Chapman 268.
 Mouton 277.
 — (siehe auch Delezenne und Mouton).
 Much 279. 308. 309. 337. 344. 347. 354. 360. 361. 363. 367. 368. 468.
 — und Holzmann 368.
 Mühsam und Jacobsohn, J. 371.

- Müller 80. 116. 256. 315.
 — (siehe auch Wiens und Müller).
 — und Jochmann 166. 176.
 — und Kolaczek 242. 323.
 — E. 134.
 — (siehe auch Litmanowicz und Müller, E.).
 — Eduard 100. 101. 113.
 — F. 459.
 — Fr. 241. 465.
 — Julius 92.
 — P. Th. 269. 320. 490.
 — Thurgau 51. 85. 87. 94.
 — W. (siehe Allemann und Müller, W.).
 Münter 128.
 — (siehe auch Schneidewind, Meyer und Münter).
 Müntz 474.
 Mulder 82. 474.
 Muraschew 204. 308. 316.
 Musculus 96. 436.
 — und Gruber 61. 123. 125.
 — und v. Mering 116.
 Musso (siehe Manetti und Musso).
 Mutch 435.

 Naegeli 69.
 Nägeli (siehe Karrer und Nägeli).
 v. Nägeli 111.
 Nagao 140.
 Nagaoka (siehe Kellner, Mori und Nagaoka).
 Nakayama 233. 451.
 Napias (siehe Pottevin und Napias).
 Nasse 48. 51. 80. 87. 92. 116. 125.
 Nathan (siehe Friedberger und Nathan).
 Navassart 277.
 Neidig (siehe Dox und Neidig).
 Neilson und Lewis 114.
 — und Terry 90.
 Neißer und Koenigsfeld 324.
 Nelikjanz 308. 381.
 Nelson (siehe Falk und Nelson).
 Nencki 10. 118. 119. 461. 493.
 — und Sieber, Nadina 273. 298.
 Nepper und Riva 254.
 Neppi (siehe Ascoli und Neppi).
 Nernst 18. 48. 58.
 Neubauer 367. 442.
 — und Fischer 171.
 — und Vogel 442.
 Neuberg 71. 141. 147. 244. 249. 335. 381. 455. 536.
 — (siehe auch Blumenthal und Neuberg und Blumenthal, Jacoby und Neuberg).
 Neuberg und Beitzke (siehe Beitzke und Neuberg).
 — Caspari und Löhe 249.
 — und Karczag 486.
 — und Lachmann 78.

 Neuberg und Marc 147.
 — und Marx 76.
 — und Milchner 448.
 — und Ohta 152.
 — und Reicher 463. 465. 467.
 — und Richter 241.
 — und Rosenberg 465.
 — und Saneyoshi 33. 60.
 Neumann 313. 456. 486.
 — und Kowarski 36.
 Newcombe 132.
 Nieloux 474. 480. 501.
 — (siehe auch Henri und Nieloux; Camus und Nieloux).
 Nicola 440.
 Nicolle und Pozerski 227.
 Nieden 382.
 Niemann (siehe Funk und Niemann).
 Nierenstein und Schiff 184. 185. 196.
 Niesner und Rewald 336.
 Nieszytko 368. 373. 381.
 Nitzesco 377.
 Nobécourt und Merklen 493.
 Noc 316.
 Noguchi (siehe Wohlgemuth und Noguchi).
 Nolf 291. 293. 295. 296. 300. 301. 304. 307—309. 358.
 Nürnberg 329.

 Obermayer und Pick 215.
 Oefele (siehe Groß, Oefele und Rosenberg).
 Oeholm 41.
 Oehrl und Schittenhelm 172.
 Oeller und Stephan 382.
 Oguro 321. 334.
 Ohta (siehe Neuberg und Ohta).
 Oker-Blom 209.
 Omeis 45.
 Omorokow 352.
 Opie 249.
 — und Barker 249. 315.
 — Barker und Dochez 324.
 Oppenheimer 3. 5. 32. 33. 41. 60. 61. 69. 70. 82. 150. 154. 156. 160. 162. 170. 176. 191. 210. 227. 228. 259. 273. 274. 291. 296. 298. 310. 320. 349. 435. 440. 443. 459. 468. 472.
 — (siehe auch Herzog, R. O. und Oppenheimer; Jolles und Oppenheimer).
 — und Aron 163. 200.
 — und Michaelis 162. 311.
 — und Rosenberger 163.
 Oppler 198. 394.
 — (siehe auch Abderhalden und Oppler).
 — und Rona 45. 68.
 Orkin, Frieda 91.
 Ormerod (siehe Armstrong und Ormerod).
 Ortloff 147.

- Osborne 41. 42.
 — und Campbell 79.
 — und Zobel 120.
 Oshima 41.
 Ost 64.
 Ostwald, Wilhelm 5. 110. 111. 208.
 — Wolfgang 512. 527.
 O'Sullivan 42. 52. 96. 127. 200.
 — und Tompson 41—43. 45. 50. 55. 56.
 Otto und Winkler 432.
 Ovid 255.

 Pacchione 322.
 Pachon, C. J. und Pachon, Marie 377.
 — Marie (siehe Pachon, C. J. und Pachon, Marie).
 Pagenstecher 460.
 Pages (siehe Arthus und Pages).
 Pagliai 114.
 Pagniez (siehe le Sourde und Pagniez).
 Paine (siehe Harden und Paine; Hudson und Paine).
 Painter (siehe Chittenden und Painter).
 Palier 167.
 Palitzsch 196. 202.
 — und Walbum 185. 202.
 Palladin 164. 190.
 Pantanelli 58. 137. 276.
 Panton (siehe Dudgeon, Panton und Wilson).
 Papazolu (siehe Lampé und Papazolu).
 Paracelsus 1. 2.
 Paratschuk (siehe Pawlow und Paratschuk).
 Parmentier und Deycax 275.
 Parozzani (siehe Scurti und Parozzani).
 Paschutin 116. 171.
 Pasteur 15. 16. 276.
 — und Joubert 436.
 Pathen (siehe Kossel und Pathen).
 Patridge (siehe Jones und Patridge).
 Patten und Stiles 90.
 Pauli 110. 112.
 — und Handovsky 110.
 Pauly 458.
 Pavy 94.
 — und Bywaters 51.
 Pawlow 100. 261. 262. 266. 273. 304. 305. 329.
 — und Paratschuk 257. 261.
 Payen 79. 96.
 — und Persoz 5. 17. 79.
 Pearce (siehe Macleod und Pearce).
 Peche 150.
 Peckolt 275.
 Peiper 382.
 Peirce 504.
 — (siehe auch Loevenhart und Peirce).
 Péju (siehe Doyon, Morel und Péju).
 Pekelharing 266. 273. 290. 291. 298. 299. 463. 481.
 Pekelharing und Huiskamp 298.
 — und Ringer 49.
 Pelouze 474.
 Pennington und Hepburn 461.
 Pernossi (siehe Fermi und Pernossi).
 Perrin 41.
 Persch (siehe Pringsheim und Persch).
 Persoz (siehe Payen und Persoz).
 Pesci 249.
 v. Pesthy 459. 489.
 Peters 79. 254.
 Petersen 54.
 Petit 81.
 Petri (siehe Heilner und Petri).
 Petruschewski 277.
 Petry 249. 256. 258. 282.
 Petteruti und Ferro 114.
 Pettibone Chauncey J. Valette (siehe Abderhalden und Pettibone).
 Pfaundler 118. 168.
 Pfeffer 275.
 Pfeiffer 253.
 — und Riecke 253.
 — H. 274. 344. 348. 349.
 — (siehe auch Hertle und Pfeiffer).
 — und Mita 349.
 Pfersdorff 466.
 Pfeiderer 270.
 Pflüger 107. 458.
 Pförringer (siehe Kafka und Pförringer).
 Pfreimter 430.
 Phillips 4.
 Philoche 62. 83. 84.
 — (siehe auch Henri und Philoche).
 di Piazza (siehe Pitini und di Piazza).
 Picciolo 92.
 Pick (siehe Obermayer und Pick).
 Pictet, A. 514. 518. 522. 523.
 — und Jahn 513. 516. 517.
 — und Pictet, J. 523.
 Piéron 54.
 Pierozek (siehe Chraszcz und Pierozek).
 Pighini 455. 461. 463.
 Pincussohn 379. 381.
 — (siehe auch Abderhalden, Caemmerer und Pincussohn).
 — (siehe Abderhalden und Pincussohn).
 — siehe Abderhalden, Freund und Pincussohn).
 — (siehe Abderhalden, Pincussohn und Walther).
 — (siehe Abderhalden, Pincussohn und Weichardt).
 — (siehe Abderhalden, Rona, Medigreceanu und Pincussohn).
 Pini 114.
 Pinkuss 321.
 v. Pirquet 354.
 Pistorius 430.
 Pitini und di Piazza 463.

- v. Planta 53.
 Plaut 382.
 Plenge 455.
 Pleß 156.
 Pletnew (siehe Cohnheim und Pletnew).
 Plimmer 64. 70. 71.
 Plinius 254.
 Plósz und Tiegel 118.
 Plutarch 254.
 de Poggenpohl 321.
 Policard (siehe Doyon, Morel u. Policard).
 Pollak 101. 189. 196. 227.
 — (siehe auch Lenk und Pollak).
 Pollini 248.
 Polya 314.
 Pomeranz 137.
 Pons 184.
 Popper (siehe Glæßner und Popper).
 Porcher 72. 73.
 Porges 367.
 — und Przibram 241.
 — und Spiro 302.
 Port (siehe Mosbacher und Port).
 Porter 262.
 Potakow-Pracaitis 196.
 Pottévin 20. 24. 70. 71. 80. 116. 148. 463.
 469. 482. 501. 502.
 — und Napias 42.
 Pozerski 89. 90. 275. 297.
 — (siehe auch Délézenne, Mouton und
 Pozerski).
 — (siehe auch Nicolle und Pozerski).
 Pozzi-Escot 493.
 Praetorius 213.
 Prašek (siehe Landsteiner und Prašek).
 Pregl 382.
 — und de Crinis 218. 382. 390. 394.
 Preti 89. 93. 246. 248. 272.
 Pribram 79.
 — und Löwy 470.
 Pringle (siehe Cramer und Pringle).
 Pringsheim 133. 134. 507. 512. 513. 518.
 520. 530.
 — (siehe auch Abderhalden und Prings-
 heim; Joseph und Pringsheim).
 — und Aronowsky 520.
 — und Dernikos 520.
 — und Eisner 512.
 — und Langhans 126. 512.
 — und Laßmann 520.
 — und Lichtenstein 512.
 — und Persch 512.
 — und Zemplén Geza 76.
 Proskauer 194.
 Przibram (siehe Porges und Przibram).
 Pugliese 80.
 — und Coggi 318.
 Pulfrich 215.
 Pulvermacher (siehe Kuttner und Pulver-
 macher.)
 Pupo 194.
 Purjesz 322.
 Quinau 139.
 Rachford 461.
 Ramond 460.
 Ranc (siehe Bierry und Ranc).
 Rakoczy 263. 328.
 Rapp 276.
 — (siehe auch Buchner und Rapp).
 Rathsmann (siehe Abderhalden und Rathsmann).
 Raubitschek 233.
 Raudnitz 259. 260. 268.
 Rauschenbach 290.
 Ravenna 150.
 Rayleigh 216.
 Reach 505.
 Reed und Stahl 168.
 Rees und Will 275.
 Reh 448.
 Reich (siehe Bauer und Reich; Krüger,
 M. und Reich).
 Reichel 187. 273.
 — und Spiro 258. 272. 284. 285.
 Reicher 206.
 — (siehe auch Neuberg und Reicher).
 Reichert 93.
 Reinbold (siehe Abderhalden und Rein-
 bold).
 Reinitzer 81. 132.
 Reiser (siehe Emmerling und Reiser).
 Reiß 133.
 Remedi und Bolognesi 318.
 Rettgers 277. 293. 300.
 Rewald (siehe Niesner und Rewald).
 Reyehler 80.
 Reye 293. 302.
 Riber (siehe Grünhut und Riber).
 Richardson (siehe Thomson und Richard-
 son).
 Richet 87. 355. 368. 438.
 Richter (siehe Neuberg und Richter).
 Riecke 41.
 — (siehe auch Pfeiffer und Riecke).
 Riegel 476.
 Riegler 340.
 Rießer 438.
 van Rijn 147.
 Rilliet (siehe Abderhalden und Rilliet).
 Rinaldini 115.
 Ringer 527.
 — (siehe auch Pekelharing und Ringer).
 — und Trigst 87.
 Riva (siehe Roux und Riva; Trémol-
 lières und Riva; Nepper und Riva).
 Roaf 164.
 Roberts 102. 103. 262.

- Robertson 54. 215. 216. 328. 527.
 — Irvine und Dobson 53.
 — und Schmidt 190.
 Robiquet 142. 147.
 — (siehe auch Boutron und Robiquet).
 Roche 321.
 Röden 261. 319.
 Röder (siehe Wohlgenuth und Röder).
 Röhmnn 53.
 Römer 434.
 Rößle 349.
 Roger 89—91. 254.
 Rogozinski 233.
 Rominger 378.
 Rona 460. 462. 484. 487. 490.
 — und Michaelis 68. 460. 462.
 — (siehe auch Abderhalden und Rona;
 Abderhalden, Rona, Medigreceanu und
 Pincussohn; Michaelis und Rona;
 Oppler und Rona).
 Rose 206.
 Rosell 246. 493.
 Rosenbach 313.
 Rosenberg 459. 479.
 — (siehe auch Groß, Oefele und Rosen-
 berg; Gigon und Rosenberg; Joure-
 vitsch und Rosenberg; Neuberg und
 Rosenberg).
 Rosenberger (siehe Oppenheimer und
 Rosenberger).
 Rosenblatt (siehe Bertrand und Rosen-
 blatt).
 Rosenfeld 330.
 Rosenheim und Shaw-Mackenzie 462.
 481.
 Rosenstadt 402.
 Rosenthal 318. 324. 325.
 Rosenthaler 141. 142. 153.
 Rosetti 264.
 Roßbach 275.
 Rothmann 441.
 Rotondi 256.
 Roubakine 432.
 Rouge 468. 473.
 — (siehe auch Chodat und Rouge).
 Rousseu (siehe Brocq, Rousseu und
 Gain).
 Roux (siehe Maquenne und Roux).
 — und Riva 314.
 — und Savignac 321.
 — und Yersin 352.
 Rowland (siehe Hedin und Rowland).
 Rubinstein 319.
 — (siehe auch Weinberg und Rubin-
 stein).
 Rubner 463. 466.
 Rübsamen 382.
 Rüchel und Spitta 309.
 Ruhland 53.
 Rulot 242. 307.
 Russel (siehe Brodie und Russel; Bab-
 cock und Russel).
 Ruszyna 28. 362.
 Ryan, S. 114.
 — und Ebrill 149.
 Rzasnicki (siehe Landau und Rzasnicki).
 Sabatowski (siehe Franke und Saba-
 towski).
 Sabbatani 296. 316.
 Sabrazès 303.
 Sachs, H. und F. 133. 278. 319. 449. 453.
 474.
 Sahli 35. 105. 120. 123. 164. 165. 167.
 174. 187. 193. 199. 215. 221. 259. 269.
 280. 283. 288. 422—426. 428. 429. 437.
 438. 476.
 Saiki 82. 135.
 Saint-Seruin 338.
 Saito 128. 276.
 Salaskin 233. 236.
 — (siehe auch Lawrow und Salaskin).
 — und Zaleski 438.
 Salazar (siehe Bierry und Salazar).
 Salkowski 41. 42. 88. 114. 181. 212. 276.
 442.
 Sallinger 93. 113. 119. 122.
 — (siehe auch v. Kaufmann, Lewite,
 Jacoby und Sallinger).
 Salomon 367. 448.
 — (siehe auch Bondi und Salomon).
 Samec 86. 93. 107—112. 121—123. 126.
 140. 210. 511. 524. 533.
 — und Mayer, Anka 532.
 — und Hoefft 111. 124.
 — und Jencic 107. 108. 124.
 Samuelsohn 471.
 Samojloff 183. 196. 296.
 Samson-Himmelstjerna 290.
 Saneyoshi (siehe Neuberg und Saneyoshi).
 Sanguinetti 128.
 Sarvonat (siehe Doyon, Dubrulle und
 Sarvonat).
 Sasaki 168.
 Satta und Gastaldi 324.
 — und Lattes 452.
 Sauli 336.
 de Saussure 79.
 Savaré 224.
 Savignac (siehe Roux und Savignac).
 Sawjalow 184. 185. 187. 188. 191. 192.
 257. 260. 262. 329.
 Sawitsch 261. 262. 304.
 — (siehe auch Migay und Sawitsch).
 Saxl 248. 380. 482. 496.
 — (siehe auch Heß, L. und Saxl).
 Schäffer 82. 276.
 Schaeffer, G. (siehe auch Catin-Gru-
 zewska, Mayer, A. und Schaeffer, C.)
 — und Terroine 230.

- Schapiro, Marie 192. 193. 198. 221. 223.
 Schardinger 126. 512. 530.
 Schaumberg 100.
 Scheele 71.
 Scheffer (siehe Bierry und Scheffer).
 Schellenberg 132.
 Schenk 45. 68. 276. 349.
 Schepowalnikow 304.
 Schern 261.
 Scheuerlen (siehe Klemperer und Scheuerlen).
 Scheunert 134.
 Schierbeck 87.
 Schiff 161. 182—184. 210. 382.
 — (siehe auch Nierenstein und Schiff).
 Schifferer 125.
 Schilling (siehe Abderhalden und Schilling).
 Schippers 323. 328.
 Schirokauer und Wilenko 117.
 Schittenhelm 349. 438. 443. 449. 451.
 — (siehe auch Abderhalden und Schittenhelm; Frank und Schittenhelm; Kunzel und Schittenhelm; London und Schittenhelm; Oehrl und Schittenhelm).
 — und Bodong 309.
 — und Brahm 446.
 — und Schmid 443.
 — und Schröter, F. 455.
 — und Wiener, K. 450.
 Schlecht 349.
 — (siehe auch Wiens und Schlecht).
 — und Wittmund 326.
 Schlesinger 83. 86. 92. 105. 116. 117.
 — (siehe auch Fuld und Schlesinger; Sherman und Schlesinger).
 Schlumpert und Hendry 389.
 Schlosing 437. 438.
 Schloßmann und Engel 253.
 Schmanlowitsch 277.
 Schmiedeberg 293. 294. 435.
 Schmid (siehe Abderhalden und Schmid; Schittenhelm und Schmid).
 Schmidt 156. 468. 499.
 — (siehe auch Abderhalden und Schmidt; Bidder und Schmidt, Robertson und Schmidt).
 — Adolf 449. 478.
 — A. (Mühlheim) 301.
 — Alexander 254. 290—292.
 — -Nielsen 256. 258. 261. 264. 268. 448.
 Schneider und Lohmann 157.
 Schneidewind, Meyer, D. und Munter 88. 91.
 Schoen (siehe Fernbach und Schoen).
 Schönbein 11.
 Schoenburg (siehe Steppenhausen und Schoenburg).
 Scholz (siehe Klieneberger und Scholz).
 Schorer 193. 215.
 Schorlemmer 197.
 Schoumow-Simanowski 298.
 Schouten 166.
 Schreiber 466.
 Schröder (siehe Bettmann und Schröder).
 Schroeder 128. 276. 369.
 Schröter, F. 455.
 Schrumpf 298.
 Schryver 240.
 — und Bayer, G. 241.
 Schubert (siehe Hönig und Schubert).
 Schüle 116.
 Schütz, E. und J. 83. 177. 187—193. 195. 210—214. 228. 230. 233. 276. 285. 472. 473. 490. 499.
 — (siehe auch Fürth und Schütz; Wassermann und Schütz).
 — E. und Huppert 187. 192. 212. 214.
 Schütze 72. 365. 469.
 — (siehe auch Bergell und Schütze).
 — und Bergell 54.
 — und Braun, K. 93.
 Schützenberger 276. 474.
 Schumm 174.
 Schumoff-Simanowski und Sieber 465. 484. 486.
 Schulze 127. 239.
 — Karl (siehe Ebstein und Schulze).
 Schultz 116. 303. 497.
 Schwann 116. 161.
 Schwartz, G. und Kayser, H. 466.
 Schwarz, B. und O. 317. 318.
 — (siehe auch v. Fürth und Schwarz).
 Schwarzer 96.
 Schwarzschild 224.
 Schweizer 525.
 Schwenning 246.
 Scurti und Parozzani 468.
 Sedgwick 459.
 Seegen 116.
 Seemann (siehe Kutscher und Seemann).
 Segale 461.
 Segelcke und Storch 284. 285.
 Seillière 133. 134.
 Seitz 349.
 Seligmann 307.
 Selle 430.
 Sellier 261. 274. 319.
 Selmi 255.
 Senter 7.
 van Senus 133.
 Sericano (siehe Marino und Sericano).
 Setschenow 181.
 Seymour (siehe Dunlap und Seymour).
 Shaffer (siehe Buxton und Shaffer).
 Shaw-Mackenzie (siehe Rosenheim und Shaw-Mackenzie).
 Shibata 437.
 Shiga 438.

- Sherman, Kendall und Clark 97.
 — (siehe auch Kendall und Sherman).
 — und Schlesinger 79.
 Sieber Nadina 117. 461. 465.
 — — (siehe auch Schumoff-Simanowski
 und Sieber, Nencki und Sieber).
 — — und Dzierzowski 128.
 Siegfeld 285.
 Siegfried 194.
 Sigmund 474.
 Silvestrini 242.
 Simon 83. 114. 156.
 — und Stassano 305.
 Singer 382.
 Sjöqvist 192. 200. 209. 210. 213.
 Sjöström (siehe Hämäläinen u. Sjöström).
 Sittmann 275.
 Skrabal 115.
 Skutetz 441.
 Sladen (siehe Hinman und Sladen).
 Sleswyk (siehe Abderhalden und Sles-
 wyk).
 Slosse und Limbosch 81. 90. 94. 471.
 Slowtzoff 256. 258.
 van Slyke 175. 219.
 — (siehe auch Levene und van Slyke).
 Smeliansky 268. 271.
 Smith 155.
 — (siehe auch Chittenden und Smith;
 Loeb und Smith).
 v. Smoluchowski 41.
 Söhngen 466. 471.
 Söldner 272.
 Sörensen 49. 59. 87. 112. 175. 192. 219.
 226. 330. 331. 474.
 — und Jessen-Hansen 219.
 Soetbeer und Jacoby 241.
 Soldin (siehe Langstein und Soldin).
 Solera 140.
 Sollied (siehe Lintner und Sollied).
 Solms 206.
 Somló und Lászloffy 92.
 Sommaruga 466.
 Sommerfeld 397.
 Sommerville 502. 503.
 Sorauer 135.
 Souder (siehe Loevenhart und Souder).
 Soula (siehe Abelous und Soula).
 le Sourde und Pagniez 309.
 Soxhlet 68. 98. 476. 525.
 — (siehe auch Hansen und Soxhlet).
 Spaleitta 50.
 Spät (siehe Weil und Spät).
 Spatzier 156. 157.
 Spriggs 207. 208.
 Spengel 398.
 Spieckermann und Bremer 468.
 Spiro 256. 271.
 — (siehe auch Porges und Spiro; Rei-
 chel und Spiro).
 Spiro-A. her 458.
 Spitta (siehe Ruchel und Spitta).
 Stade 459. 472. 476. 486.
 Staedeler 141.
 Stahl (siehe Reed und Stahl).
 Stangassinger (siehe Gottlieb und Stang-
 assinger).
 Starkenstein 89. 117. 139.
 Starling (siehe Bayliss und Starling).
 Stassano (siehe auch Simon und Stas-
 sano).
 — und Billon 305. 465. 484.
 — und Daumas 296.
 Staub (siehe Karrer, Staub und Wälti).
 Stauber (siehe Glaefner und Stauber).
 Steeg 336.
 Steele (siehe Irvine und Steele).
 Steinbeck (siehe Abderhalden und Stein-
 beck).
 v. Stenitzer 275.
 Stephan (siehe Oeller und Stephan).
 Stephenson 70.
 Steppenhausen und Schoenburg 336.
 Stern, Lina (siehe Battelli und Stern).
 — und Eppenstein 316.
 Sternberg (siehe Zuntz und Stern-
 berg).
 Steudel 445. 446.
 Stewart (siehe Chittenden und Ste-
 wart).
 Stiles (siehe Harlow und Stiles; Patten
 und Stiles).
 Stoklasa, Jelinck und Vitek 53.
 Stoll (siehe Willstätter und Stoll).
 Stolz 482.
 Stone und Wright 128.
 Stookay 248.
 Storch (siehe Segeleke und Storch).
 Stoward 48.
 Strantz, Else 255.
 Strauch (siehe Abderhalden und Strauch).
 Straughn und Jones 443.
 Straus 70.
 Streich (siehe Wohlgemuth und Streich).
 Stromberg 292.
 Stutzer 253. 456.
 — -Barnstein 253.
 — und Isbert 252. 253.
 Sule 500.
 Sundberg 298.
 Suzuki (siehe Bail und Suzuki).
 — Yoshimura und Takaishi 499.
 Swedenberg 460.
 Sykes und Mitchell 97.
 Sylvius 1. 2. 3.
 v. Syniewski 111. 124.
 — (siehe auch Klassen und Syniewski).
 Szanto, Olga 276.
 — (siehe auch Wohlgemuth und Szanto).
 Szydłowski 268.

- Takaishi (siehe Suzuki).
 Takamine Jokichi 103. 128.
 — (siehe auch Doyen und Takamine).
 Takemura 233. 275.
 Tammann 16. 17. 47. 59. 136. 152. 154. 157.
 Tanaka 82. 462. 463. 474. 480.
 Tanfani 471.
 Tangl 80.
 Tanret 124. 521.
 Taylor 5. 54. 84. 160. 189. 241. 277. 496. 501. 503.
 Tebb 120.
 Teodoresco 453.
 Ternuchi (siehe Abderhalden und Ternuchi).
 Terroine 459. 462—464. 471. 481. 495.
 — (siehe auch V. Henri und Terroine; Kalaboukoff und Terroine; Morel und Terroine; Schaeffer und Terroine).
 — und J. Weill 89.
 Terry (siehe Neilson und Terry).
 Thénard 5. 276.
 Theophratus 254.
 Thibierge 156.
 Thomas (siehe auch Kühn, Thomas und Böttcher).
 — und Frouin 140.
 — und Weber 198. 221. 222.
 Thoma-Zeiß 347.
 Thoms 194.
 Thomson 156.
 — und Richardson 147.
 Thöni 340. 365.
 Thovet 41. 257.
 Tichomirow 206. 261.
 Tiegel (siehe Plösz und Tiegel).
 van Tieghem 53.
 Tiraboschi 277.
 Tischler 82.
 Tobler 259. 269.
 Tomono (siehe Moro und Tomono).
 Tompson (siehe O'Sullivan und Tompson).
 Tonegutti 468.
 Traube, J. 346. 347. 487. 493.
 — M. 10. 118.
 Trebing (siehe Brieger und Trebing; Fürstenberg und Trebing).
 Trémollières und Riva 254.
 Treub 150.
 Trigt (siehe Ringer und Trigt).
 Truffi 248.
 v. Tschermak 135.
 Tschernorutzki 128. 452. 456.
 Tschlenoff 477.
 Turpin 14.
 Turro und Gonzaley 350.
 Twort 430.
 Tyndall 532.
 Ugglas Beth af (siehe Euler und Beth af Ugglas).
 Uhlenhuth 337—339.
 — und Weidanz 339.
 Umber 249.
 — und Brugsch 459.
 Ungermann (siehe Dold und Ungermann).
 Ussow (siehe Zuntz und Ussow).
 Vandevelde 44. 54. 70. 241.
 — (siehe auch de Waele und Vandevelde).
 Vaughan und Wright 353.
 Vauquelin (siehe Fourcroy und Vauquelin).
 Vemoussy 113.
 Vernon 80. 85. 167. 178. 199. 230. 233. 251. 261. 298. 304. 320.
 Verworn 247.
 Vidal 341. 342.
 Vierordt 503.
 Vigliani 116.
 Vinci und Chistoni 310.
 Vines 171. 191. 233. 275.
 Vinson 53.
 Vintilesco 78.
 Virchow-Hirsch 139.
 Visco 471.
 Visentini 313.
 Visser 58. 154.
 Vitek (siehe Stoklasa, Jelinek und Vitek).
 Vogtlin (siehe Abderhalden, London und Vögtlin).
 — und Jones 450.
 Voelkel 377.
 Vogel (siehe Neubauer und Vogel).
 Voinov 414.
 Volhard 192. 210. 221—223. 283. 459. 472. 476. 477. 486.
 Vollrath 156.
 de Vries 111.
 Vulquin 151.
 — (siehe auch Lisbonne und Vulquinn).
 Waage (siehe Guldberg und Waage).
 Wachsmann (siehe Grützner und Wachsmann).
 Wade 207.
 de Waele 277. 295. 310. 370. 382.
 — und Vandevelde 277.
 Waeli 324.
 Walti (siehe Karrer, Staub und Walti).
 Wahlenberg 478.
 Wakabayashi und Wohlgemuth 459.
 Wakemann 241.
 Walbum (siehe Madsen und Walbum; Palitzsch und Walbum).
 Waldschmidt 178.
 Waldvogel 241. 244. 465.
 Walker 307.

- Walko 449.
 Wallach 118.
 Waller (siehe Bywaters und Waller).
 Walters 189.
 Walther 100. 101.
 — (siehe auch Abderhalden, Pincussohn und Walther).
 Warburg 498.
 Ward Marshall 133.
 Warfield 171.
 Wartenberg (siehe Constein, Hoyer und Wartenberg).
 Wassermann 249. 347. 365—368.
 — und Bruck 363. 366.
 — und Citron 423. 434.
 — und Schütz 337.
 Wasserzug 52.
 Watson 92.
 Weber (siehe Thomas und Weber).
 — M. 401. 402. 408.
 Wedemeyer 165.
 Weeg 275.
 Weekers 233.
 Wegener 367—369. 382.
 Wegscheider 213.
 Wehmer 132.
 Weichardt 346. 349. 351.
 — (siehe auch Abderhalden, Pincussohn und Weichardt).
 Weidanz (siehe Uhlenhuth und Weidanz).
 Weigert 27.
 Weil, G. und R. 321. 341. 366. 373. 391.
 — und Spat 346.
 Weill, J. (siehe Terroine und Weill, J.).
 Weinberg und Aznar 432.
 — und Laroche 324.
 — und Mello 321.
 — und Rubinstein 318.
 Weinkopf 313.
 Weinland 54. 70. 233. 314.
 Weinstein 171.
 Weir 277.
 Weis 191. 227. 233.
 Weißmann 398.
 Wells 241.
 — und Benson 241.
 — (siehe auch Benson und Wells; Mendel und Wells).
 Welsch 304. 324.
 — und Chapman 336.
 Welter 501.
 Wendelstadt und Toni Fellmer 336. 354. 365.
 Went 128.
 Werbitzki 372.
 Wernken 272.
 Wersilowa (siehe London und Wersilowa).
 Wertheim 156.
 Werzberg 170.
 Wesbrock (siehe Hankin und Wesbrock).
 Westhauser 253.
 Weyland 247.
 — (siehe auch Woker und Weyland).
 Wezumba, Marie 221.
 White 275.
 Widdicombe 53.
 Wicchowski 194. 443.
 Wiener 247.
 — (siehe auch Schittenhelm und Wiener).
 Wiens 322—324.
 — und Müller 322.
 — und Schlecht 323.
 Wieselm 114.
 Wiesner 132.
 Wijsman 80.
 Wildermuth (siehe Abderhalden und Wildermuth).
 Wilenko (siehe Schirokauer und Wilenko).
 Will 52. 276.
 — (siehe auch Gorup und Will; Rees und Will).
 — und Körner 156.
 — und Laubenheimer 156.
 Willenz 493.
 Williamson 118.
 — (siehe auch Hall und Williamson).
 Willstätter und Stoll 499.
 Wilson (siehe Pudgeon, Panton und Wilson).
 Windaus 498.
 Windisch und Boden 91.
 Wingrave 128.
 Winkler (siehe Otto und Winkler).
 Winternitz (siehe Jones und Winternitz).
 — und Meloy 470.
 Winterstein 247. 413. 536.
 Wirth, Ch. (siehe Lintner und Wirth, Ch.).
 Vital 438.
 Witte 45. 198. 206.
 v. Wittich 79. 178.
 Wittmack 275.
 Wittmund (siehe Schlecht und Wittmund).
 Wohl 522.
 — und Glimm 81. 85. 93. 95. 522.
 Wöhler 2.
 Wohlgemuth 45. 70. 87—90. 92. 98. 103 bis 106. 114—117. 119—121. 123. 128. 197. 203. 230. 231. 236. 237. 241. 249. 261. 280. 282. 286. 302. 326. 330. 332. 333. 437. 457. 465. 467. 484. 533.
 — (siehe auch Fuld und Wohlgemuth; Löwenthal und Wohlgemuth; Wakabayashi und Wohlgemuth).
 — und Noguchi 116. 117.
 — und Röder 261.
 — und Streich 171.
 — und Szanto 237.
 Wohllebe 82.
 Woiodoff 176. 187.

- Woker 9. 28. 85. 99. 110. 119. 120. 150.
 186. 247. 319. 355. 376. 527.
 — (siehe auch Breslauer und Woker;
 Maggi und Woker).
 — und Maggi 115. 120. 527.
 — und Weyland 247.
 Woldridge 293. 304.
 Wolff 93. 140.
 — (siehe auch Fernbach und Wolff;
 Gessard und Wolff).
 — und Fernbach 523. 527.
 — und Geslin 521.
 — M. und Frank, K. 380.
 Wolff-Eisner 348. 353.
 Wolffhügel 194. 298.
 Wood, R. W. 88.
 Woodgatt (siehe Jacque und Wood-
 gatt).
 Woolley (siehe Mellanby und Woolley).
 Wortmann 53. 81. 82. 85. 128. 133.
 Wright 278. 298. 303. 359.
 — (siehe auch Stone und Wright; Vaug-
 han und Wright).
 — und Douglas 433.
 Wróblewski 42. 79. 97. 194. 271. 460.
 Wullstein 313.
 Wurtz 275.
 — und Bouchut 275.
 Wynhausen 116. 117.
- Yersin (siehe Roux und Yersin).
 Yoshimoto 240. 242. 249.
 Yoshimura (siehe Suzuki).
- Zach (siehe Emil Fischer und Zach).
 Zak 249. 277. 299.
 Zaleski 499.
 — (siehe auch Salaskin und Zaleski).
 Zegla 117.
 Zeiß (siehe Löwe-Zeiß und Thoma-Zeiß).
 Zellner 82. 128. 277. 473. 501.
 Zemplen Geza 436.
 — (siehe auch Fischer, Emil und Zemplen
 Geza; Pringsheim und Zemplen Geza).
 Zeri 470. 488.
 Ziegler und Jochmann (siehe Jochmann
 und Ziegler).
 Zielstorff (siehe Köhler, Bornstein und
 Zielstorff).
 Zinßer 459. 476. 489.
 Zobel (siehe Osborne und Zobel).
 Zulkowsky 79. 124.
 — und König 79.
 Zunz 230. 231. 239. 295. 297. 299. 307.
 308. 311. 349.
 Zuntz und Sternberg 259.
 — und Ussow 461.
 Zweifel 114.

Errata.

Auf S. 201 ist in der 2. Zeile (der Überschrift) der Passus „zu nicht nachfüllbaren Produkten“ zu ersetzen durch „zu nicht mehr fallbaren Produkten“.